

AUS DEM INSTITUT FÜR HUMANGENETIK  
PROF. DR. RER. NAT. BERNHARD WEBER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MUTATIONSANALYSEN IN *BBS2* UND *BBS4* BEI PATIENTEN  
MIT DEM BARDET-BIEDL SYNDROM**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kai Nagel

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Holger G. Gassner
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Definition und Erstbeschreibung des Bardet-Biedl Syndroms (BBS)	1
1.2	Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl Syndroms	2
1.3	Epidemiologie des Bardet-Biedl Syndroms	3
1.4	Das Bardet-Biedl Syndrom: Eine Ziliopathie	4
1.5	BBS-Gene und Genprodukte	11
1.6	Vererbung des Bardet-Biedl Syndroms	12
1.7	Fragestellung und Ziele dieser Studie	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.2	Oligonukleotide	23
2.3	Software und Datenbanken	26
2.4	Methoden	27
2.4.1	DNA-Isolierung aus Blutleukozyten	27
2.4.2	DNA-Aufreinigung	27
2.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.5	Single-stranded-conformational analysis (SSCA)	28
2.6	Sequenzierung von PCR-Produkten	29
<b>3</b>	<b>Patienten und Kontrollpersonen</b>	<b>31</b>
3.1	Patientenkollektiv	31
3.2	Kasuistik der Familie 2053	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	Molekulargenetische Analysen des <i>BBS2</i> -Gens	38
4.1.1	Amplifizierung der Exons des <i>BBS2</i> -Gens	38
4.1.2	SSCA zur Fragmentlängen- und Konformationsanalyse im <i>BBS2</i> -Gen	39
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der SSCA des <i>BBS2</i> -Gens	44
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Segregationsanalyse in <i>BBS2</i>	45
4.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalysen im <i>BBS2</i> -Gen	46
4.2	Molekulargenetische Analysen des <i>BBS4</i> -Gens	48
4.2.1	Amplifizierung der Exone des <i>BBS4</i> -Gens	48
4.2.2	SSCA zur Fragmentlängen- und Konformationsanalyse im <i>BBS4</i> -Gen	49
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der SSCA des <i>BBS4</i> -Gens	51

4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalysen im <i>BBS4</i> -Gen	52
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen der <i>BBS2</i> - und <i>BBS4</i> -Gene	52
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1	Methodendiskussion	53
5.1.1	Labormethoden	53
5.1.2	SSCA und Sequenzanalyse	54
5.2	Klinische und epidemiologische Diskussion	57
5.2.1	Klinische Diagnose des Bardet-Biedl Syndroms	57
5.2.2	Phänotypvergleich der Schwestern 2169 und 2168 aus der Kasuistik dieser Arbeit	60
5.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Marburger BBS-Arbeitsgruppe für das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit	62
5.4	Der Vererbungsmodus des Bardet-Biedl Syndroms	69
5.5	Die humangenetische Beratung bei BBS-Familien	70
5.6	Ausblick	72
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>84</b>
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	84
9.2	Lebenslauf	85
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung	87

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Erstbeschreibung des Bardet-Biedl Syndroms (BBS)

Das BBS ist eine multisystemische, autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die durch die Kardinalsymptome Retinitis pigmentosa, postaxiale Polydaktylie, syndrombedingte Adipositas, Hypogonadismus bei Männern, komplexe urogenitale Fehlbildungen bei Frauen und Nierenfehlbildungen charakterisiert wird. Zusätzlich kommt es zu einem vermehrten Auftreten von mentaler Retardierung, Bluthochdruck, Taubheit, angeborenen Herzfehlern und Diabetes mellitus.

Erstmalig wurde das Syndrom im Jahre 1920 von dem französischen Allgemeinmediziner Georges Bardet beschrieben (Bardet 1920). Unabhängig davon berichtete bereits zwei Jahre später der Österreicher Arthur Biedl, Pathologe und Endokrinologe in Prag, über ein nahezu identisches Syndrom (Biedl 1922). Die Übereinstimmung der beiden Krankheitsbilder war eindeutig, so dass man zu dem Schluss kam, es müsse sich um das gleiche Syndrom handeln. Die Erkrankung wird seitdem als Bardet-Biedl Syndrom (BBS; OMIM 209900) bezeichnet.

**Tabelle 1-1: Klinische Merkmale des BBS unterteilt in Haupt- und Nebenkriterien** (Beales et al. 1999), in Klammern die prozentuale Häufigkeit des Vorkommens der Symptome

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Retinitis pigmentosa (93 %)	Sprachverzögerung (54 %) Entwicklungsverzögerung (50 %) Koordinationsstörungen (40 %)
Polydaktylie (90 %)	Brachydaktylie (46 %) Schielen / Linsentrübung / Astigmatismus
Adipositas (72–90 %)	Zahnstellungsanomalien (27 %) Hyper- / Hypodontismus
Hypogonadismus bei Männern und komplexe urogenitale Fehlbildungen (90 %)	Taubheit (21 %) Syndaktylie (9 %)
Nierenfehlbildungen (90 %)	Diabetes mellitus (6 %) Diabetes insipidus
Mentale Retardierung (60 %)	Herzfehler (7 %) Leberfunktionsstörungen

Die Diagnose des BBS wird klinisch anhand der in Tabelle 1–1 genannten Haupt- und Nebenkriterien gestellt. Ein laborchemischer Parameter, der zur Diagnose führt, ist nicht bekannt. Zur weiteren Differenzierung und Abgrenzung des Krankheitsbildes wurden in den letzten Jahren zusätzliche Nebenkriterien vorgeschlagen (Tabelle 1-1). Die Diagnose eines BBS gilt als wahrscheinlich, wenn drei oder mehr Hauptkriterien und mindestens zwei Nebenkriterien in Erscheinung treten (Beales et al. 1999). Die Lebenserwartung der Patienten ist durch einige der auftretenden Symptome vermindert. Insbesondere Nephropathien und hypertensionsbedingte kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen die Komorbidität und Mortalität (Moore et al. 2005).

Bislang konnten 16 BBS-Gene (*BBS1-BBS16*) identifiziert werden (OMIM 209900). Soweit bekannt, führen Mutationen in BBS-Genen zu Proteindefekten, die eine Dysfunktion primärer Zilien im gesamten Organismus provozieren können. Daher manifestiert sich das BBS als eine multisystemische Erkrankung.

## 1.2 Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl Syndroms

Die Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes des BBS gibt Anlass zur Erläuterung verwandter Krankheitsbilder. Vor der Erkenntnis, dass es sich beim BBS um eine Ziliopathie handelt, waren das McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS) und das Laurence-Moon Syndrom (LMS) die klassischen Differentialdiagnosen (Tabelle 1–2).

**Tabelle 1-2: Klinische Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl Syndroms**

Kardinalsymptome	Bardet-Biedl Syndrom (BBS)	McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS)	Laurence-Moon Syndrom (LMS)
Retinitis pigmentosa	+	-	+
postaxiale Polydaktylie	+	+	-
Adipositas	+	-	-
Hypogonadismus	+	-	+
Nierenfehlbildungen	+	(-)	-
mentale Retardierung	+	(-)	+
Hydrometrokolpos	+	+	+
vaginale Atresie	(-)	+	-
kongenitale Herzfehler	(-)	+	-
spastische Paraplegie	-	-	+

### **McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS)**

Das MKKS (OMIM 236700) ist durch den Symptomenkomplex postaxiale Polydaktylie, vaginale Atresie mit Hydrometrokolpos und kongenitalen Herzfehlern gekennzeichnet (Stone et al. 2000). Es handelt sich um ein autosomal-rezessiv vererbtes Syndrom. Da sowohl die postaxiale Polydaktylie als auch der Hydrometrokolpos bei MKKS- und BBS-Patienten auftreten, wurde ein Zusammenhang bei der Entstehung beider Syndrome vermutet (David et al. 1999).

### **Laurence-Moon Syndrom (LMS)**

Das LMS (OMIM 245800), erstmals beschrieben von dem englischen Diabetologen J. Z. Laurence und seinem Assistenten, dem Ophthalmologen R. Moon (Laurence und Moon 1866), stellt sich klinisch ähnlich dem BBS mit Retinitis pigmentosa, mentaler Retardierung und Hypogonadismus dar. Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv (Farag und Teebi 1988). Aufgrund der Ähnlichkeit der phänotypischen Merkmale geht man davon aus, dass sich dieses Krankheitsbild in den Symptomenkomplex des BBS subsummieren lässt (Moore et al. 2005).

## **1.3 Epidemiologie des Bardet-Biedl Syndroms**

Das Auftreten des BBS variiert stark in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen (Tabelle 1–3). Bei Beduinenvölkern Kuwaits und in einer isolierten Neufundlandpopulation konnte eine besonders hohe Prävalenz bei Geburt beobachtet werden (Farag und Teebi 1989; Green et al. 1989; Teebi 1994). Innerhalb der kaukasischen Population, in der das BBS relativ selten auftritt, wird die höchste Prävalenz bei Geburt für Dänemark beschrieben (Bruhl et al. 2001; Katsanis 2004). Eine Prävalenz für Deutschland ist nicht bekannt.

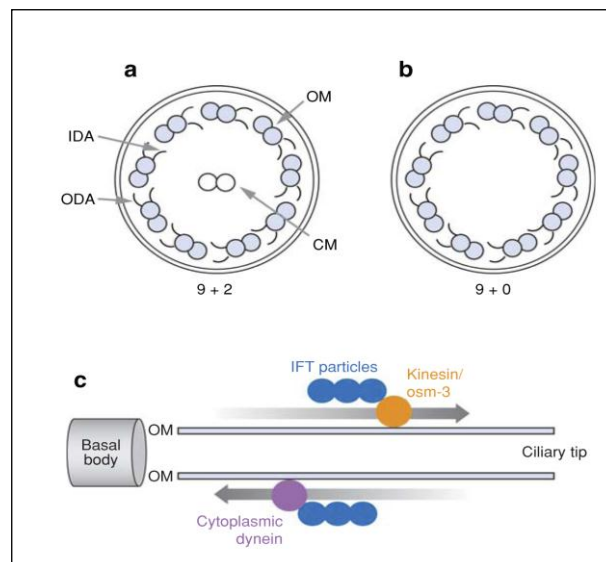
**Tabelle 1-3: Prävalenz des BBS in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen**

<b>Population</b>	<b>Prävalenz</b>	<b>Literatur</b>
Nordamerika und Europa	1:140.000–160.000	Katsanis 2004
Dänemark	1:59.000	Bruhl et al. 2001
Neufundland	1:17.500	Green et al. 1989
Kuwait	1:17.000	Farag und Teebi 1989
Beduinenvölker	1:13.500	Teebi 1994

## 1.4 Das Bardet-Biedl Syndrom: Eine Ziliopathie

### Ultrastruktur der Zilien

Im Jahr 2003 stellten Ansley und Mitarbeiter die Hypothese auf, dass das BBS durch eine Dysfunktion von Zilien verursacht wird (Ansley et al. 2003). Zilien und Flagellen sind entwicklungsgeschichtlich konservierte zelluläre Strukturen, die vor mehr als 100 Jahren entdeckt wurden. Sie befinden sich auf Zelloberflächen und können unterschiedliche biologische Funktionen übernehmen (Zimmermann 1898). Im Einzelnen sind das Zellbewegung, Flüssigkeitstransport, Chemo-, Mechano- und Fotosensation und sexuelle Reproduktion. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Zilien auch sensorische Funktion übernehmen. Wie eine Antenne erkennen sie extrazelluläre Signalmoleküle und leiten entsprechende Informationen in das Zellinnere weiter (Baker und Beales 2009).



**Abbildung 1–1: Schematische Darstellung der motilen 9+2 Zilien (a), primären 9+0 Zilien (b) und des intraflagellären Proteintransports (IFT) (c)** (Badano et al. 2006). OM = outer microtubules, die neun äußeren Paare der Mikrotubuli. CM = central microtubules, das zentrale Paar der Mikrotubuli. ODA und IDA = äußere und innere Dyneinarme: Diese verlaufen von einem OM zum nächsten und können sich energieabhängig bewegen. (c) Entlang der OM erfolgt der IFT. Für den anterograden (in Richtung der Spitze des Ziliums) Proteintransport wird die Energie über Kinesin gewonnen, für den retrograden (in Richtung der Basis des Ziliums) Transport über zytoplasmatisches Dynein.



Zilien werden, in Abhängigkeit von ihrer molekularen Grundstruktur, in zwei Typen unterteilt (Abbildung 1–1). Zum einen gibt es primäre oder immotile Zilien, die aus neun paarigen, im Kreis angeordneten Mikrotubuli (9+0) aufgebaut sind, und zum anderen motile Zilien, die ein zusätzliches Paar von zentralen Mikrotubuli beinhalten (9+2) (Bandano et al. 2006).

Mikrotubuli haben neben einer Stützfunktion insbesondere auch die Aufgabe, als Leitschiene für den intraflagellären Proteintransport (IFT) zu dienen. Da in den Zilien keine eigene Proteinsynthese erfolgt, ist der IFT eine Voraussetzung für den Aufbau und die Funktion der Zilien. Die Synthese der strukturellen und funktionellen Bestandteile der Zilien findet im Zytoplasma statt (Badano et al. 2006). Im Rahmen des IFT werden Proteinpartikel anterograd, vom Zytosol zur Zilienspitze, entlang der Mikrotubuli unter Verwendung der durch Kinesin zur Verfügung gestellten Energie transportiert. Der retrograde Transport erfolgt aktiv über durch Dynein gewonnene Energie (Badano et al. 2006).

Typischerweise haben Primärzilien zwei Zentriolen, die Mutter- und Tochterzentriole genannt werden. Die Mutterzentriole wird auch Basalkörperchen genannt. Dieses dient einerseits der Verankerung der Zilie, andererseits als Ausgangspunkt und Sortierstelle für den Proteintransport in die Zilie. Die Tochterzentriole ist für die Zellteilung von Bedeutung.

### **Polyphänie des Bardet-Biedl Syndroms**

BBS-Proteine sind sowohl im Bereich der Zentrosome als auch in der Nähe der Basalkörper zilientragender Zellen lokalisiert (Beales 2005). Das Zentrosom übernimmt Aufgaben bei der Steuerung der Zellteilung, der neuronalen Migration und des vesikulären Transports (Badano et al. 2006). Die Polyphänie des BBS ist Ausdruck der Vielzahl der Störungen, die durch BBS-Mutationen verursacht werden können.

Für jedes der BBS-Hauptkriterien existieren pathologische Modelle, die den wahrscheinlichen Mechanismus des Ziliendefektes beschreiben. Tabelle 1–4 gibt einen Überblick über die klinisch-pathologische Bedeutung der Defekte des Zilienapparates.

Tabelle 1-4: Klinisch-pathologische Bedeutung der Defekte des Zilienapparates

Klinisches BBS-Hauptkriterium	Zilienfunktion, deren Defekt ein klinisches Bild unterstützt
<b>Retinale Dystrophie</b>	Als Verbindung des äußeren Segmentes mit dem inneren Segment der sensorischen, retinalen Neurone dient eine immotile Zilie. Hier findet ein IFT von Proteinen statt, die für die Formation und Funktion der Fotorezeptorzelle unerlässlich ist. Bei <i>BBS2</i> - und <i>BBS4</i> -Knockout Mäusen wurde eine verfrühte Apoptose der Rezeptorzellen zwischen der 7.–10. Woche festgestellt (Blacque und Leroux 2006).
<b>Postaxiale Polydaktylie</b>	Sowohl in den ektodermalen als auch in den mesenchymalen Zellen der embryonalen Extremitätenknospe wurden sensorische Zilien nachgewiesen. Eine exakte Differenzierung dieser Zilienzellen ist notwendig, um im Verlauf der Entwicklung eine korrekte anatomische Anordnung der einzelnen Glieder zu erzielen. Angenommen wird, dass die morphogenetische Weiterleitung von Signalen, die für die Differenzierung der Zellen notwendig ist, aufgrund einer Dysfunktion der Zilien nicht fehlerfrei geschieht (Blacque und Leroux 2006; Bialas et al. 2009).
<b>Adipositas</b>	BBS-Knockout Mäuse nehmen 10–20 % mehr Nahrung zu sich als gesunde Tiere (Blacque und Leroux 2006). Zudem wird im Vergleich zu einer gesunden Maus bei BBS-Knockout Mäusen eine vermehrte stammbetonte Ablagerung von Fettzellen registriert (Mykytyn et al. 2004). Zilien leisten einen wichtigen Beitrag bei der Rezeptor- und Signalsteuerung in der multifaktoriellen Genese der Adipositas (Kim et al. 2008).
<b>Mentale Retardierung</b>	Für die Liquorzirkulation im Gehirn sind motile Zilien notwendig. Ferner ist ein ungestörter Partikeltransport entlang den Mikrotubuli der langen Axone des zentralen Nervensystems zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Neurons wichtig (Leitch et al. 2008).
<b>Männlicher Hypogonadismus</b>	Die Funktion der Spermienmotilität ist in einem hohen Maße von motilen Zilien abhängig. Das vermehrte Auftreten fehlformierter Zilien kann zur Ausbildung eines Hypogonadismus beitragen (Mykytyn et al. 2004).
<b>Renale Anomalie</b>	Die Genprodukte der an der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankungen (ARPKD) beteiligten Gene wurden wie die BBS-Proteine in den Basalkörpern von Zilien nachgewiesen. Möglicherweise sind die BBS-Proteine an dem Transport oder der korrekten Lokalisierung der ARPKD-Proteine beteiligt. Daher führen fehlende oder defekte BBS-Proteine zu renalen Anomalien (Tobin und Beales 2007).

## Differentialdiagnosen des BBS als Ziliopathie

Mit zunehmendem Wissen über die Funktion primärer Zilien und den Symptomen, die entstehen, wenn die Funktion der Zilien gestört ist, kommen weitere Erkrankungen als Differentialdiagnose für das BBS in Betracht (Tabelle 1–5).

**Tabelle 1-5: Überschneidung der Kardinalsymptome des BBS mit Kardinalsymptomen von vier Erkrankungen mit ziliärer Dysfunktion** (Badano et al. 2006). ● = Vorhandensein eines Merkmals.

	BBS	Orofaciodigital Syndrom Type I (OFD1)** (OMIM 311200)	Senior- Loken Syndrom (OMIM 266900)	Meckel- Gruber Syndrom (OMIM 249000)	Joubert- Syndrom (OMIM 21330)
Retinitis pigmentosa	●	-	●	●	●
Zystische Nierenerkrankung	●	●	●	●	●
Polydaktylie	●	●	-	●	●
Situs inversus	●	-	●	●	●
Mentale Retardierung / Entwicklungsverzögerung	●	●	-	●	●
Hypoplasie des Corpus callosum	●	●	-	●	●
Dandy-Walker Malformation***	●	-	●	●	●
Posteriore Enzephalozele	●*	-	-	●	●
Lebererkrankungen	●	●*	●	●	●

\*bei Mäusen nachgewiesen. \*\*Orofaciodigital Syndrom Typ I. \*\*\*Dandy-Walker-Malformation = Fehlen des Kleinhirnwurms und eine zystische Erweiterung der vierten Hirnkammer.

BBS-Patienten werden zu 90 % mit einer postaxialen Polydaktylie, Hypogonadismus bei Männern und komplexen urogenitalen Fehlbildungen geboren (Beales et al. 1999). Die Polydaktylie wird bei Geburt auch bei OFD1, dem Meckel-Gruber Syndrom und dem Joubert-Syndrom beobachtet. Von Hypogonadismus und Infertilität sind vor allem die männlichen BBS-Patienten betroffen. Klinisch zeigt sich eine Hypoplasie des Corpus callosum und ein reduziertes Hodenvolumen (Bell 1958; Klein und Ammann 1969). Ein verkürzter Penis tritt auch bei Patienten mit OFD1, dem Meckel-Gruber Syndrom und dem Joubert-Syndrom auf. Bei weiblichen BBS-Patienten zeigen sich komplexe urogenitale Fehlbildungen, wie hypoplastische Eileiter, Uterus und Ovarien, eine Vaginalatresie, ein Uterus duplex oder ein persistierender Sinus urogenitalis (Klein und Amman 1969; Nadjmi et al. 1969; Campo und Aaberg 1982; Srinivas et al. 1983; Cramer et al. 1988; Green et al. 1989; Stoler et al. 1995; Mehrotra et al. 1997; Uguralp et al. 2003).

Während Neugeborene und Säuglinge mit BBS meist normalgewichtig sind, kommt es ab dem zweiten bis dritten Lebensjahr zu einer überproportionalen Gewichtszunahme und Adipositas. Bei BBS-Patienten zeigt sich häufig eine stammbetonte Adipositas.

Zudem tritt ab dem achten Lebensjahr eine Nachblindheit auf, die bis zu dem 15. bis 20. Lebensjahr zu einer vollständigen Blindheit fortschreitet (Baker und Beales 2009). Die Erstdiagnose einer Retinitis pigmentosa wird bei BBS-Patienten durchschnittlich mit neun Jahren gestellt (Baker und Beales 2009). Wobei die für die Retinitis pigmentosa typischen Funduspigmentierungen, die Gesichtsfeldeinengung, die Nachtblindheit und das erloschene Elektroretinogramm bereits bei Patienten ab dem 14. Lebensmonat diagnostiziert werden können (Runge et al. 1986). Retinitis pigmentosa zeigt sich auch bei Patienten mit einem Senior-Loken Syndrom, Meckel-Gruber Syndrom und Joubert-Syndrom.

Nierenerkrankungen sind bei BBS-Patienten besonders relevant, da sie die häufigste Todesursache darstellen. Bereits in der Kindheit zeigen sich bei 90 % der BBS-Patienten Nierenfehlbildungen (Beales et al. 1999). Bei einem Drittel der BBS-Patienten kommt es zu einer chronischen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit (Baker und Beales 2009). Ein Viertel der BBS-Patienten sterben vor dem 43. Lebensjahr an den Folgen der Nephropathien (Bruhl et al. 2001). Zystische Nierenerkrankungen werden bei allen in Tabelle 1–5 genannten Syndromen beobachtet.

### **Pathogenese des Bardet-Biedl Syndroms**

Ansley und Mitarbeiter (2003) haben wesentliche Aspekte der Pathogenese des BBS beschrieben. Sie konnten das BBS8-Protein spezifisch in den Zentrosomen und in den Basalkörpern von Zilien nachweisen (Ansley et al. 2003). Hier interagiert es mit einem Protein der perizentriolären Region, dem PCM1-Protein (pericentriolar material 1). PCM1 ist an der Ziliogenese beteiligt. Daher kann dem BBS8-Protein ebenfalls eine Bedeutung bei der Ziliogenese zugeschrieben werden (Blacque et al. 2004). Gleiches wurde für das BBS14-Protein gefunden (Kim et al. 2008). Als weiterer Hinweis für eine Beteiligung des BBS8-Proteins an der Ziliogenese dient der immunhistochemische, ubiquitäre Nachweis des Proteins in unterschiedlichen Ziliengewebe, wie beispielsweise in der Retina und in der Bronchialschleimhaut. Letztlich wurden die Proteine weiterer homologer BBS-Gene (*BBS1*, *BBS2* und *BBS7*) in *Caenorhabditis elegans* ausschließlich in zilientragenden Zellen nachgewiesen (Blacque et al. 2004).

Zusammengefasst lassen diese Erkenntnisse eine Abhängigkeit der Zilienfunktion von BBS-Proteinen vermuten.

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Genprodukte, die in Zusammenhang mit der Entstehung anderen pleiotropen Erkrankungen stehen, wie zum Beispiel bei OFD1, Senior-Loken Syndrom, Meckel-Gruber Syndrom (MKS), und Joubert-Syndrom, ebenfalls in der Zilie lokalisiert sind (Badano et al. 2006). Die Überschneidungen bei den Kardinalsymptomen und die identische zelluläre Lokalisation der Genprodukte der genannten Syndrome lassen einen zumindest teilweise gemeinsamen Pathomechanismus vermuten (Tabelle 1–5). Daher sind diese Erkrankungen als zusätzliche Differentialdiagnosen für das BBS anzusehen.

### ***BBS2* und *BBS4* in der Pathogenese des Bardet-Biedl Syndroms**

Der erste Genort, der dem BBS zugeordnet wurde, war *BBS2* (ein 17-Exon-Gen). Nishimura und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass bei *BBS2*-Knockout Mäusen das Rhodopsin, eines der Sehpigmente in der Retina, nahezu vollständig im Zellkörper der Fotorezeptoren akkumuliert und die Zellen schädigt. Nur zu einem geringen Teil wird es an den seiner Funktion entsprechenden Bestimmungsort, in die Peripherie, transportiert. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass das *BBS2*-Protein den Transport von Rhodopsin in die Zellperipherie begünstigt (Nishimura et al. 2004). Zusätzlich wurde bei *BBS2*-Knockout Mäusen eine verfrühte Apoptose der retinalen Rezeptorzellen nachgewiesen (Nishimura et al. 2005). Dieser Pathomechanismus führt bei Menschen vermutlich zu dem Leitsymptom der Retinitis pigmentosa.

*BBS4* (16 Exone) ist ebenfalls in die Pathogenese des BBS involviert. Das *BBS4*-Protein ist im Basalkörper des Ziliums lokalisiert (Tobin und Beales 2007). Es zeigt eine weitreichende Sequenzhomologie mit der O-N-Acetylglucosamin-Transferase (OGT). Dieses Enzym soll mitverantwortlich für Insulinresistenzen sein und eine Rolle bei der Ausprägung des Diabetes mellitus Typ I spielen (Mykytyn et al. 2001). Eine Studie an *BBS4*-Knockout Mäusen zeigt, dass eine fehlerhafte Zilienanordnung in verschiedenen Zellen des Hodens bei männlichen Mäusen zu Hypogonadismus führt (Mykytyn et al. 2004). Neben der fehlerhaften Zilienanordnung kommt es durch ein fehlendes oder defektes *BBS4*-Protein bei Mäusen auch zu einem beschleunigten Verlust der Fotorezeptorzellen (Nishimura et al. 2005). Dies lässt vermuten, dass auch

dem BBS4-Protein eine Rolle in der Pathogenese der Retinitis pigmentosa und des Hypogonadismus bei Menschen zukommt.

Kim und Mitarbeiter (2004) untersuchten ebenfalls die Beteiligung des BBS4-Proteins an der Pathogenese des BBS. Wie bei dem BBS8-Protein stellten sie eine Interaktion des BBS4-Proteins mit dem perizentriolär gelegenen Protein PCM1 fest. PCM1 ist an der Anordnung und Verankerung der Mikrotubuli beteiligt. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen BBS4, BBS8 und PCM1 ist die Abhängigkeit von dem Transportprotein Dynein. Bei Knockout Mäusen ohne Dynein zeigte sich ein abnormales, diffuses zytosolisches Vorkommen von PCM1. Zusätzlich konnte perinukleär kein BBS4-Protein registriert werden (Kim et al. 2004). Dynein scheint demnach für die korrekte perinukleäre Lokalisation beider Proteine mit verantwortlich zu sein. Das BBS4-Protein spielt im Rahmen des intrazellulären Transportes eine Rolle als Adapterprotein für Dynactin. Der Proteinkomplex aus BBS4 und Dynactin übernimmt den Transport von PCM1 in die Sattelitenregion der Zilie.

## 1.5 BBS-Gene und Genprodukte

Mit Hilfe von Kopplungs- und Mutationsanalysen in BBS-Familien konnten inzwischen 16 BBS-Gene identifiziert und charakterisiert werden (Tabelle 1–6). Studien an klinisch diagnostizierten BBS-Familien, die keine Kopplung zu den bekannten BBS-Genen aufweisen, deuten darauf hin, dass weitere Genloci oder bis heute nicht entdeckte Mutationen in den bekannten Loci existieren. Man geht davon aus, dass mit den Genen *BBS1-BBS12* und deren Mutationen etwa 75 % aller Mutationen, die mit BBS korrelieren, bekannt sind (Muller et al. 2010). Es handelt sich hierbei um Missense- und Nonsensemutationen, sowie Insertionen, Deletionen und splice-site Mutationen. Am häufigsten werden mit 32,6 % Mutationen in *BBS1*- und *BBS10*-Genen nachgewiesen, gefolgt von *BBS12*, mit einer Mutationshäufigkeit von 10,9 %. Alle weiteren Gene tragen zu jeweils < 10 % an der Gesamtheit der Mutationen des BBS bei (Muller et al. 2010).

**Tabelle 1-6: BBS-Gene**

Gen	Position	Proteinfunktion	Zelluläre Lokalisation	OMIM	Literatur
<i>BBS1</i>	11q13	Zilienfunktion	Basalkörper / Zilium	209901	Tobin und Beales 2007
<i>BBS2</i>	16q21	Zilienfunktion Flagellaformation	Basalkörper / Zilium	606151	Tobin und Beales 2007
<i>BBS3</i>	3p13	Vesikelkoordination	Basalkörper / Zilium	600151	Tobin und Beales 2007
<i>BBS4</i>	15q23	mikrotubulärer Transport	Basalkörper perizentrioläre Region	600374	Tobin und Beales 2007
<i>BBS5</i>	2q31	Zilienfunktion Flagellaformation	Basalkörper / Zilium	603650	Tobin und Beales 2007
<i>BBS6</i>	20p12	Zilienfunktion Flagellaformation	Basalkörper / Zilium	604896	Tobin und Beales 2007
<i>BBS7</i>	4q32	IFT-particle-assembly	Basalkörper / Zilium	607590	Tobin und Beales 2007
<i>BBS8</i>	14q31	IFT-particle-assembly	Basalkörper / Zilium	608132	Tobin und Beales 2007
<i>BBS9</i>	7p14.3	Parathormon-Antwort	Zellen mit Zilien	607968	Nishimura et al. 2005
<i>BBS10</i>	12q21	Zilienfunktion	Basalkörper / Zilium	610148	Stoetzel et al. 2006 Laurier et al. 2006
<i>BBS11</i>	9q33	Protein/Protein- Interaktion	interagiert mit <i>BBS1</i> und <i>BBS9</i>	602290	Chiang et al. 2006
<i>BBS12</i>	4q27	Zilienfunktion	interagiert mit <i>BBS6</i> und <i>BBS10</i>	610683	Stoetzel et al. 2007
<i>BBS13</i>	17q23	Zilienfunktion	Basalkörper / Zilium	609883	Kytalla et al. 2006
<i>BBS14</i>	12q21.3	Zilienfunktion	Basalkörper Zentrosom	610142	Leitch et al. 2008
<i>BBS15</i>	2p15	Proteininteraktion	Zellen mit Zilien	613580	Kim et al. 2010
<i>BBS16</i>	1q43	Proteininteraktion	Zentrosom	613615	Otto et al. 2010

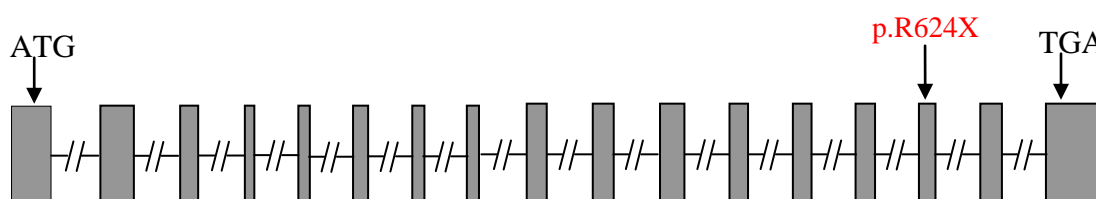
IFT = intraflagellärer Transport

Die beiden häufigsten Mutationen sind nach Angaben der internationalen Literatur die Punktmutation c.1169T>G im Exon 12 des *BBS1*-Gens, die zum Austausch einer Aminosäure im Protein führt (p.M390R), und die Rasterschubmutation c.270\_271insT, im Exon 2 des *BBS10*-Gens, die für das Protein die Mutation p.C91fsX95 codiert. Diese beiden Mutationen sind bei 20 % aller BBS-Patienten mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft nachzuweisen (Stoetzel et al. 2006). Im *BBS11*-Gen ist dagegen bisher nur eine Mutation in einer israelischen konsanguinen Familie beschrieben worden (Chiang et al. 2006).

Billingsley und Mitarbeiter (2010) berichten über einen hohen Anteil an Neumutationen. In einer Kohorte von 93 BBS-Patienten in 74 Familien waren 68 % aller gefundenen Mutationen bisher nicht beschrieben und daher Neumutationen.

### Genstruktur des *BBS2*-Gens

Der *BBS2*-Locus erstreckt sich über ein 2,69 cM großes Intervall auf dem langen Arm des Chromosoms 16q21. Das Gen setzt sich aus 17 Exons und 16 Introns zusammen, die insgesamt eine Größe von 35,6 kb ausmachen. Die codierende Sequenz umfasst 2163 bp, die als Vorlage für ein Protein bestehend aus 721 Aminosäuren dienen (Nishimura et al. 2001).



**Abbildung 1–2: Genstruktur des *BBS2*-Gens (Acc.No.: AC010537)** (Nishimura et al. 2001). Die Rechtecke repräsentieren die einzelnen Exons 1–17. Das Startcodon ATG liegt in Exon 1, das Stoppcodon TGA in Exon 17. In Exon 15 wurde die heterozygote Punktmutation p.R624X (c.1870C>T) bei Patient 2094 gefunden.

### Mutationen im *BBS2*-Gen

Mutante Allele im *BBS2*-Gen treten in einer europäischen Population mit einer Häufigkeit von 5,4 % bezogen auf die Gene *BBS1-12* auf (Muller et al. 2010). Das *BBS2*-Gen ist mit 8,1 % am häufigsten an der digen-triallelischen Vererbung beteiligt (Katsanis 2004). In den unten aufgeführten Tabellen wird eine Auswahl der häufigsten aus der Literatur bekannten Mutationen nach Missense-, Nonsensemutationen



(Tabelle 1-7) und Deletionsmutationen (Tabelle 1-8) aufgelistet. Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen von den Dunnen und Antonarakis (2000).

**Tabelle 1-7: Missense- und Nonsensemutationen im *BBS2*-Gen.** X = Kettenabbruch.

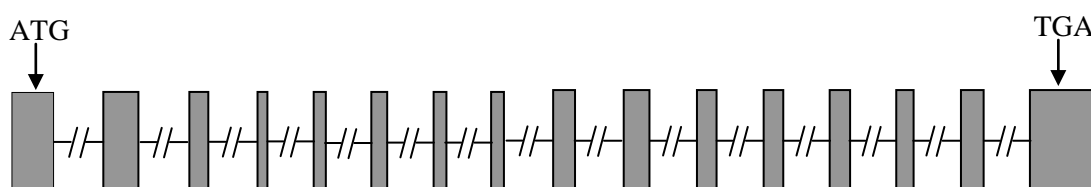
Exon	Mutation	Codon-Austausch	Referenznummer	Literatur
1	p.R23P	CGC-CCC	CD051297	6
2	p.Q59X	CAG-TGA	CM012899	1
2	p.N70S	AAC-AGC	CM012900	1
2	p.V75G	GTC-GGC	CM011282	2
2	p.D104A	GAT-GCT	CM012901	1
4	p.D174E	GAT-GAA	CD032101	1
6	p.R216X	CGA-TGA	CM012902	1
6	p.R234X	CGA-TGA	CD051297	6
8	p.R275X	CGA-TGA	CM012903	1
8	p.R315Q	CGG-TGG	CM012904	1
8	p.R315W	CGG-CAG	CM012905	1
10	p.L349W	TTG-TGG	CD051297	5
11	p.R413X	CGA-TGA	CD051298	4
14	p.T558I	ACT-ATT	CD051721	3
16	p.R643H	CGT-CAT	CD051298	4
Literatur: 1 Katsanis et al. 2001a				
2 Nishimura et al. 2001				
3 Katsanis et al. 2001b				
4 Fauser et al. 2003				
5 Hoskins et al. 2003				
6 Karmous-Benailly et al. 2005				

**Tabelle 1-8: Deletionsmutationen im *BBS2*-Gen**

Exon	Deletion	Codon	Referenznummer	Literatur
3	c.402delT	134	CD051721	3
4	c.512-513delTT	171	CD032101	2
6	c.627-627delTT	209	CD051721	3
8	c.940delA	313	CD011587	1
15	c.1808-1809delAT	603	CD051298	4
16	c.1909-1910delAT	637	CD051298	4
Literatur: 1 Nishimura et al. 2001				
2 Hoskins et al. 2003				
3 Hichri et al. 2005				
4 Karmous-Benailly et al. 2005				

### Genstruktur des *BBS4*-Gens

Der *BBS4*-Locus erstreckt sich über ein 1 cM großes Intervall auf dem langen Arm des Chromosom 15q23. Das Gen setzt sich aus 16 Exonen und 15 intronischen Sequenzen zusammen, die insgesamt eine Größe von 52 kb ausmachen (Abbildung 1–3). Die codierende Sequenz umfasst 2469 bp. Diese codieren ein Protein bestehend aus 173 Aminosäuren (Mykytyn et al. 2001).



**Abbildung 1–3: Genstruktur des *BBS4*-Gens (ACC. No.: CM021492)** (Mykytyn et al. 2001). Die Rechtecke repräsentieren die Exons 1–16. Das Startcodon ATG liegt in Exon 1, das Stoppcodon TGA in Exon 16.

### Mutationen im *BBS4*-Gen

In einer europäischen Studienpopulation liegt die Allelfrequenz für Mutationen im *BBS4*-Gen bei 5,8 % bezogen auf die Gene *BBS1–12* (Muller et al. 2010). Das *BBS4*-Gen ist nach *BBS6* (5,8 %) mit 2,3 % am dritthäufigsten an der digen-triallelischen Vererbung beteiligt (Katasnis 2004). In den unten aufgeführten Tabellen werden die häufigsten aus der Literatur bekannten Mutationen nach Missense-, Nonsense- (Tabelle 1–9) und Insertionsmutationen (Tabelle 1–10) aufgelistet. Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen von den Dunnen und Antonarakis (2000).

**Tabelle 1-9: Missense- und Nonsensemutationen im *BBS4*-Gen**

Exon	Mutation	Codon-austausch	Referenznummer	Literatur
8	p.N165H	AAT-CAT	CM021492	1
12	p.R295P	CGA-CCA	CM011911	2
12	p.L327P	CTC-CCC	CM021493	1
12	p.L351R	CTG-CGG	CM051392	5
13	p.A364E	GCA-GAA	CM021494	1
13	p.D368G	GAT-GGT	CM051013	6
15	p.S457I	AGT-ATT	CM021495	1
15	p.M472V	ATG-GTG	CM031938	3
16	p.P503L	CCT-CTT	CM033338	4

Literatur: 1 Katsanis et al. 2001a  
 2 Mykytyn et al. 2001  
 3 Hoskins et al. 2003  
 4 Fauser et al. 2003  
 5 Hichri et al. 2005  
 6 Karmous-Benailly et al. 2005

**Tabelle 1–10: Insertionsmutationen im *BBS4*-Gen**

Exon	Mutation	Insertion	Referenznummer	Literatur
3	IVS3-2	A-G	CS021722	1
4	IVS4-1	G-C	CS011973	2
6	IVS6-2	A-C	CS011974	2
14	4bp (TAGG)	*483	CD051723	3

Literatur: 1 Katsanis et al. 2001a  
 2 Mykytyn et al. 2001  
 3 Hichri et al. 2005  
 \* Codon

## 1.6 Vererbung des Bardet-Biedl Syndroms

Das BBS wird autosomal-rezessiv vererbt (Mykytyn et al. 2002). Daher müssen auf einem Gen zwei mutante Allele vorliegen, damit sich der Phänotyp ausprägt. Diese Konstellation ist bei homozygoten oder zusammengesetzten (compound-heterozygoten) Genmutationen gegeben. Katsanis und Mitarbeiter berichten zusätzlich von einer Konstellation mit mutanten Allelen auf mindestens zwei unterschiedlichen Genloci, die gemeinsam die Penetranz und die Expressivität des Krankheitsbildes beeinflussen (Katsanis et al. 2001a). Diese Erkenntnisse sind Hinweise für eine digene oder digen-triallelische Vererbung des Phänotyps.

### Monogener, autosomal-rezessiver Erbgang

Tabelle 1–11 zeigt ein Beispiel für einen autosomal-rezessiven Erbgang, bei dem die Ursache für die Ausprägung des Krankheitsbildes in der Verantwortung eines einzigen Gens liegt. Zwei mutante Allele eines Gens (*BBS1*) liegen in homozygoter (Individuum 1, gleiche Allele) oder compound-heterozygoter Form (Individuum 2, verschiedene Allele) vor. In weiteren BBS-Genen liegen keine Mutationen vor. *BBSx* steht für ein beliebiges BBS-Gen, nicht jedoch *BBS1*.

**Tabelle 1-11: BBS-Genotyp bei einem monogenen autosomal-rezessiven Erbgang des *BBS1*-Gens**

	<b>BBS1</b>		<b>BBSx</b>	
<b>BBS-Individuum 1</b> (homozygot in <i>BBS1</i> )	<b>M390R</b>	<b>M390R</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>BBS-Individuum 2</b> (compound-heterozygot in <i>BBS1</i> )	<b>M390R</b>	<b>I82M</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>

I = Isoleucin; M = Methionin; R = Arginin; wt = Wildtyp

## Digen-triallelischer und oligogener Erbgang

Tabelle 1–12 beschreibt die Zusammenhänge des digen-triallelischen Erbgangs, bei dem die Ursache für die Ausprägung des Krankheitsbildes nicht durch Mutationen in einem einzigen Gen verursacht wird, sondern durch eine Kombination von Mutationen in mindestens zwei Genen bestimmt ist.

Katsanis und Mitarbeiter (2000) und Slavotinek und Mitarbeiter (2000) berichten über BBS-Patienten, bei denen nur eine einzelne heterozygote Mutation in einem BBS-Gen gefunden wurde. Die gleiche heterozygote Mutation konnte bei einem Elternteil des Erkrankten nachgewiesen werden. Das Elternteil war nach klinischen Aspekten nicht an BBS erkrankt. Diese Konstellation führt zur Hypothese, dass bei diesen Erkrankten eine weitere Mutation vorliegen muss, die in Verbindung mit dem mutierten BBS-Gen zur Ausprägung des Syndroms führt.

Wie in Tabelle 1–12 dargestellt, besteht bei BBS-Individuum 3 neben der homozygoten BBS1-Mutation p.M390R zusätzlich die heterozygote BBS2-Mutation p.L349W. Aufgrund der Beteiligung von mehr als einem BBS-Gen handelt es sich hierbei um einen digenen oder digen-triallelischen Erbgang (Katsanis 2004).

Für BBS-Individuum 4 ist ein weiteres Beispiel mit zwei betroffenen Genen dargestellt. Die Mutationen in BBS2 und BBS4 haben in Kombination wahrscheinlich Einfluss auf die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bei den Individuen (Fauser et al. 2003).

**Tabelle 1-12: Phänotyp bei digenem Erbgang: Individuum 3 = Mutationen in *BBS1*- und *BBS2*-Genen; Individuum 4 = Mutationen in *BBS2*- und *BBS4*-Genen.**

	BBS1		BBS2		BBS4	
<b>BBS-Individuum 3</b> <b>Mutationen</b> (Katsanis 2004)	<b>M390R</b>	<b>M390R</b>	<b>L349W</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>BBS-Individuum 4</b> <b>Mutationen</b> (Fauser et al. 2003)	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>R643H</b>	<b>wt</b>	<b>K46R</b>	<b>wt</b>

M = Methionin; R = Arginin; L = Leucin; H = Histidin; W = Tryptophan; K= Lysin; wt = Wildtyp

Die Tatsache, dass ein zweiter Genlocus die Ausprägung der Erkrankung beeinflusst, lässt vermuten, dass weitere Genloci den Phänotyp zusätzlich beeinflussen können. Somit spricht man inzwischen anstelle eines digenen von einem oligogenen Erbgang (Katsanis 2004).

Burghes und Mitarbeiter (2001) berichten, dass Mutationen, die in Nebengenen auftreten, einen modifizierenden Effekt auf den Phänotyp des BBS haben können. Nebengene sind *CCDC28*, *TMEM67* und *ARL6*. Die Idee des autosomal rezessiven Vererbungsmodus bleibt hierbei erhalten. Bandano und Mitarbeiter 2006 berichten in dem Zusammenhang der modifizierenden Nebengene über eine Familie mit zwei vom BBS betroffenen Individuen. Beide waren homozygot für p.M390R in *BBS1*. Das Vorhandensein einer weiteren heterozygoten Mutation in *CCDC28* bei einem der beiden Individuen führte zu einem deutlich progressiveren Phänotyp, insbesondere in Hinblick auf die Pathologie der Retina (Bandano et al. 2006).

Katsanis und Mitarbeiter (2001b) argumentieren hingegen, dass ein homozygoter oder compound-heterozygoter Genstatus zur Manifestation eines Syndroms nicht ausreicht. Ein drittes mutantes Allel in einem weiteren BBS-Gen sei notwendig für Ausprägung der Erkrankung.

Diese Vererbungsmodi unterscheiden sich grundsätzlich von den Mendelschen Regeln des autosomal-rezessiven Erbgangs.

## 1.7 Fragestellung und Ziele dieser Studie

In der Literatur werden direkte Zusammenhänge zwischen BBS-Mutationen in verschiedenen BBS-Genen und der Ausprägung phänotypischer Merkmale des BBS beschrieben (Leitch et al. 2008; Kim et al. 2008). Das Zusammenspiel zwischen einer Vielzahl von mutanten Allelen in Haupt- und modifizierenden Nebengenen bleibt jedoch weitestgehend unklar und ist Gegenstand aktueller Forschung.

Ziel dieser Studie war im Marburger Patientenkollektiv ( $n = 65$ ) Hinweise für einen digen-triallelischen oder oligogenen Erbgang zu finden. Aus den vorhergehenden Dissertationen Frick, Meyer und Claus der Marburger Arbeitsgruppe sind BBS-Mutationen in dem Marburger Patientenkollektiv in den Genen *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* bekannt (Tabelle 5-2).

Mutante Allele treten in einer europäischen Population im *BBS2*-Gen mit einer Häufigkeit von 5,4 % und in *BBS4* mit 5,8 % bezogen auf *BBS1-12* auf (Muller et al. 2010). Nach *BBS1*, *BBS10* und *BBS12* ist *BBS4* das Gen mit der höchsten Frequenz für mutante Allele. Außerdem sind *BBS2* (8,1 %) und *BBS4* (2,3 %) häufig an der von Katsanis und Mitarbeiter (2004) postulierten digen-triallelischen oder oligogenen Vererbung beteiligt. Daher erschien es sinnvoll die Gene *BBS2* und *BBS4* auf BBS-Mutationen zu untersuchen und die Ergebnisse zusammen mit den Mutationen in *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* in dieser Arbeit darzustellen.

Zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung der Arbeit, 2003-2004, wurde als Screeningmethode die sogenannte *single-stranded-conformational analysis* (SSCA) ausgewählt. In *BBS2* (17 Exone) sollten ausschließlich die Exone untersucht werden, in denen bereits Mutationen in der Literatur beschrieben waren (Exone 1–6, 8–10, 12 und 14–16). In *BBS4* (16 Exone) sollten alle 16 Exone untersucht werden. Aberrante DNA-Fragmente aus der SSCA sollten anschließend sequenziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
ABI Prism 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, USA
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
Einmachfolie (Zellglas)	Folia Paper, Wendelstein
Elektrophoresekammer	MWG Biotech, München
Hamilton Spritze	Hamilton, Schweiz
Hoefer SE 600 Elektrophorese Unit	Amersham, Freiburg
pH-Meter Microprocessor pH 535	WTW, Weilheim
Photometer GeneQuant <i>pro</i>	Amersham, Freiburg
Pipetten:	
Eppendorf <i>Reference</i> Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Finnpipetten	Labsystems, Finnland
Multipette	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Pipettenspitzen:	
Biosphere Quality Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Star Lab Tip One Natural Tips	StarLab GmbH, Ahrensburg
Reaktionsgefäße:	
Falcon Tubes (50 ml)	Falcon, USA
12-Strip Reaktion Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Micro Test Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Thermoblock Techne DB 3	Techne ThermoDUX, Wertheim
Thermocycler:	
Perkin Elmer Cetus GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, USA
iCycler	Biorad, München
UV-Transilluminator UVT-40M	Herolab, Wiesloch
Vortexer MS2 Minishaker	IKA Works, Wilmington USA
Waagen:	
Präzisionswaage 2254	Sartorius, Göttingen
Feinwaage AE 240	Mettler, Schweiz
Wasserbad Jürgens Typ 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Sorvall RT 6000B	DuPont, Dreieich
Eppendorf 5415 R Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Laborfuge 400	Heraeus Instruments, Hanau



## Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Sigma, München

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Riedel-de-Haen, Seelze

Serva, Heidelberg

FMC BioProducts, USA

BioWhittaker Molecular Applications, USA.

## Medien und Standardlösungen

Zur Sterilisation wurden alle Medien und Lösungen bei 123 °C für 30 min autoklaviert. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Puffer und Lösungen destilliertes Wasser verwendet.

## DNA-Extraktion

Red-Cell-Lysis-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl pH 7,6 mit HCl bzw. NaOH einstellen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 mit 1 M Salzsäure einstellen
DNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris 100 mM EDTA 1 % (w/v) SDS pH 9,0 mit NaOH einstellen

## Gelelektrophorese

5 x TBE-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA
----------------	--

## Sonstige

Ethidiumbromid-(EtBr)-Stammlösung 10 mg/ml  
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)

## Fertigsysteme (Kits)

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham, Freiburg

### PCR-Reagenzien

Taq DNA Polymerase	peQLab, Erlangen
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	peQLab, Erlangen
10 x Reaktionspuffer S	peQLab, Erlangen
Ultra Pure dNTP Comb. Kit	Clontech, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt

### Ladepuffer

6 x Agarosegel-Ladepuffer	15 % (w/v) Ficoll 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
SSCA-Gelladepuffer	95 % Formamid 20 mM EDTA (pH 7,4) 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
PAA-Gelladepuffer	30 % Glycerol 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol

### DNA-Längenstandard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder MBI	Fermentas, St.Leon-Rot
----------------------------------	------------------------

## 2.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden in „desalted“ Qualität von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe bezogen.

### ***BBS2*-Oligonukleotide**

Die Länge der Exons des *BBS2*-Gens variiert zwischen 228 bp für Exon 2 und 63 bp für Exon 4 (Tabelle 2-1). Im Folgenden sind die Primer für die Amplifizierung der Exons des *BBS2*-Gens tabellarisch aufgelistet (Tabelle 2-2). Die Exons 7, 11, 13 und 17 wurden nicht amplifiziert. Die Exons 2 und 8 wurden in Exon 2a und 2b und 8a und 8b unterteilt. Für das Exon 10 wurden zwei verschiedene Primerpaare positioniert. Die Primer der Exons 1, 3-6, 9, 12 und 14-16 wurden aus der Arbeit von Nishimura und Mitarbeitern (2001) übernommen.

**Tabelle 2-1: Größe der Exons und Introns des *BBS2*-Gens (Acc.No.: AC010537) (Nishimura et al. 2001)**

Exon/Intron	Exon [bp]	Intron [bp]
1	(156 +) 117	5.067
2	208	3.170
3	126	239
4	63	826
5	78	3.734
6	105	85
7	87	3.143
8	136	218
9	139	821
10	145	329
11	172	948
12	129	1211
13	131	558
14	137	665
15	113	11.230
16	149	724
17	107 (+311)	

**Tabelle 2-2: Oligonukleotide für die Mutationsanalyse im *BBS2*-Gen.** Grau hinterlegt sind die Primer, die selbst positioniert wurden.

Bezeichnung Forward Primer	Sequenz 5' >...< 3'	Bezeichnung Reverse Primer	Sequenz 5' >...< 3'	Annealing Temp. [°C]	Produkt (bp)
<i>BBS2</i> Ex1 / F	gcgtgagccagctccgctgc	<i>BBS2</i> Ex1 / R	gcgcggccggcgagatcctg	58	247
<i>BBS2</i> Ex2a / 74F	acctcttgtaattgtggatgtg	<i>BBS2</i> Ex2a / 322R	gctcagggttcaatacgc	57	249
<i>BBS2</i> Ex2b / 245F	ccctggaatctgatgttt	<i>BBS2</i> Ex2b / 492R	aataaatgatctgatctcttctaagc	55	248
<i>BBS2</i> Ex3 / F	tttactcaaaatctgctcagt	<i>BBS2</i> Ex3 / R	aatattattactcagtagagt	54	320
<i>BBS2</i> Ex4 / F	aatcctctccttcgatgtgct	<i>BBS2</i> Ex4 / R	ggagaagcttacacttctgtc	58	239
<i>BBS2</i> EX5 / F	agaagcagcatgcaaaagtact	<i>BBS2</i> Ex5 / R	tcacttgacagtactgatcta	57	240
<i>BBS2</i> Ex6 / F	tataaagccgtacttgacagt	<i>BBS2</i> Ex6 / R	caataactatcaagcgcctga	57	222
<i>BBS2</i> Ex7 / F	tattgtgagacttctgtgcta	<i>BBS2</i> Ex7 / R	tggtactgttctaagtcctac	*	213
<i>BBS2</i> Ex8a / 22F	ccagcagtcataaggtatctcc	<i>BBS2</i> EX8a / 271R	tccggtaactccctctacc	55	250
<i>BBS2</i> Ex8b / 185F	atgctcgaagtgaaccaac	<i>BBS2</i> Ex8b / 384R	ttcctgatattttgacccaatc	57	200
<i>BBS2</i> Ex9 / F	taagagcaggttaattgatgac	<i>BBS2</i> EX9 / R	ccctggcaatgacactctcat	57	308
<i>BBS2</i> Ex10 / 132F	agttcagtggtttggtgactg	<i>BBS2</i> EX10 / 364R	acaggtgcctctaataaccag	57	233
<i>BBS2</i> Ex10 / 15F	gagcactaatgaggtgagttc	<i>BBS2</i> EX10 / 364R	acaggtgcctctaataaccag	57	349
<i>BBS2</i> EX11 / F	acctcctgacctcgtgatctg	<i>BBS2</i> Ex11 / R	ccccaagaatccactgggcat	*	344
<i>BBS2</i> Ex12 / F	ccttaaatatcaattgatgac	<i>BBS2</i> Ex12 / R	actgctaccaataataacacat	58	344
<i>BBS2</i> Ex 13 / F	gaatgttacttaagagcatag	<i>BBS2</i> Ex13 / R	ctgaatggtaaacaccacatg	*	481
<i>BBS2</i> Ex14 / F	gctaagttgtctaacaatctg	<i>BBS2</i> Ex14 / R	acataagtacattgttagtac	57	281
<i>BBS2</i> EX15 / F	ttaattgggtataagcgaacag	<i>BBS2</i> Ex15 / R	ttatacttctattggtaacat	54	330
<i>BBS2</i> Ex16 / F	taagcttgccatatcaacatg	<i>BBS2</i> Ex16 / R	atatgaattattggatgctac	57	291
<i>BBS2</i> Ex17 / F	ttgttttaaaactgacgtcta	<i>BBS2</i> Ex17 / R	attcagcaacagtactactac	*	389

F = Forward Primer; R = Reverse Primer; Ex = Exon; \* = diese Exons wurden nicht untersucht

### BBS4-Oligonukleotide

Die Länge der Exons variiert zwischen 202 bp für Exon 15 und 45 bp für Exon 1 (Tabelle 2–5). Im Folgenden sind die Primer für die Amplifizierung der Exons des *BBS4*-Gens tabellarisch aufgelistet. Die Primer konnten aus der Arbeit von Oeffner und Mitarbeiter (2003) übernommen werden. Alle 16 Exons wurden in dieser Arbeit amplifiziert.

**Tabelle 2-5: Exon- und Introngrößen des *BBS4*-Gens (ACC. No.: CM021492)** (Mykityn et al. 2001)

Exon / Intron	Exon [bp]	Intron [bp]
1	45	*
2	52	97
3	80	177
4	64	241
5	112	353
6	73	426
7	54	480
8	128	608
9	55	663
10	69	732
11	153	885
12	172	1057
13	70	1127
14	142	1269
15	202	1471
16	998	

**Tabelle 2-6: Oligonukleotide für die Mutationsanalyse des *BBS4*-Gens**

<b>Bezeichnung forward Primer</b>	<b>Sequenz 5' &gt;...&lt; 3'</b>	<b>Bezeichnung reverse Primer</b>	<b>Sequenz 5' &gt;...&lt; 3'</b>	<b>Annealing Temp. [°C]</b>	<b>Produkt (bp)</b>
BBS4 Ex1 / F	ctcgtcgtctgggaacc	BBS4 Ex1 / R	gttccccgggacagtaaaaag	56	239
BBS4 Ex2 / F	tggatgcttcttaagtagcaag	BBS4 Ex2 / R	cagtggactctgcctccaa	62	216
BBS4 Ex3 / F	tgaggacagtgtctaaaggagaa	BBS4 Ex3 / R	gttgccctaccaacatcctg	56	200
BBS4 Ex4 / F	gcctgtccatgtccactttt	BBS4 Ex4 / R	tgccgtatcttttcaagaacc	55	269
BBS4 Ex5 / F	ttctcccagaacatggttta	BBS4 Ex5 / R	cactgttctctgtgagtgcce	56	212
BBS4 Ex6 / F	tgtgggactagtagggttagtcttc	BBS4 Ex6 / R	cagccagatgataaatggaacc	56	210
BBS4 Ex7 / F	cttgccgagcaataacaatc	BBS4 Ex7 / R	tctgcaagcactaggataatac	55	248
BBS4 Ex8 / F	tcgttcagtgtgtgatttgg	BBS4 Ex8 / R	tcactgttttaaggaaacagataca	58	207
BBS4 Ex9 / F	cgagggcattactgtgcat	BBS4 Ex9 / R	tgccaggaaaaccaccataca	58	211
BBS4 Ex10 / F	ttaactgccgtctccttgcct	BBS4 Ex10 / R	tttgcctccagggtcagat	56	202
BBS4 Ex11 / F	tgaatgacttctctgtgccca	BBS4 Ex11 / R	caaacaagaacatgagggga	57	211
BBS4 Ex12 / F	gggtctgtttgacttgcctt	BBS4 Ex12 / R	ctttggctggaagtgtgatgg	54	193
BBS4 Ex12 / F	gcaccctttgattggaagat	BBS4 Ex12 / R	ttccctcattacagatggcag	58	189
BBS4 Ex13 / F	tgagctgacaggggtgaagttt	BBS4 Ex13 / R	ggctttggagagtccaacc	59	156
BBS4 Ex14 / F	ccccagctccatagaatctc	BBS4 Ex14 / R	gcttacttatgactcttgggagctaat	56	212
BBS4 Ex15 / F	ttgtctctgacagtcacgcttt	BBS4 Ex15 / R	cagaggctgctggaaactg	56	190
BBS4 Ex15 / F	accagttaaagatcccaaatcaa	BBS4 Ex15 / R	gacacatgtggctgtacctg	56	190
BBS4 Ex16 / F	ttgtggaacatgaggattcaag	BBS4 Ex16 / R	cctaaccagcacatcctcg	52	208

F = Forward Primer; R = Reverse Primer; Ex = Exon

## 2.3 Software und Datenbanken

### Software

Textverarbeitung	Word XP, Microsoft
Datenverwaltung	Excel XP, Microsoft Access 2000, Microsoft
Primerdesign	Primer 3, Whitehead Institute for Biomedical Research <a href="http://frodo.wi.mit.edu">http://frodo.wi.mit.edu</a>
Literaturverwaltung	Endnote 6.0, Niles Software
Grafik	PowerPoint, Microsoft Photoshop 6.0, Adobe
Sequenzanalyse	Sequencher 4.1, Gene Codes

### Internetdatenbanken

#### Allgemeine Datenbanken

NCBI (National Center of Biotechnology Information)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/</a>
Gene Reviews – NCBI Bookshelf	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13</a>
HGV Human Genome Variation Society (den Dunnen und Antonarakis 2000)	<a href="http://www.hgvs.org/rec.html">http://www.hgvs.org/rec.html</a>

#### Internetadresse

#### Genomdatenbanken

Human Gene Mutation Database Cardiff	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
UCSC – Genome Bioinformatics	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Rebase (Restriction Enzyme Database)	<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
HUGO Nomenclature Committee	<a href="http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/">http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>
Whitehead Institute	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/">http://www-genome.wi.mit.edu/</a>

#### Internetadresse

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 DNA-Isolierung aus Blutleukozyten

Genomische DNA kann mit Hilfe der Aussalzmethode nach Miller aus den Zellkernen der Blutleukozyten präpariert werden (Miller et al. 1988). 10 ml EDTA-Blut (nach Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) wurden mit 30 ml kaltem RCLB (Red Cell Lysis Buffer) versetzt, geschüttelt und 10 min auf Eis gestellt. Während dieser Zeit lysierten die Erythrozyten im hypotonischen Puffer, die Leukozyten blieben intakt und konnten durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 3000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert werden. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 25 ml RCLB suspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet, das nach Verwerfen des Überstandes zurückblieb, wurde mit 5 ml SE-Puffer, 2,5  $\mu\text{l}$  Proteinase K sowie 500  $\mu\text{l}$  10 %iger SDS-Lösung versetzt. Die Proben wurden nun im Schüttelwasserbad bei  $55^{\circ}\text{C}$  für drei Stunden oder bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Die freigesetzten Proteine der Leukozyten wurden durch Zugabe von 2 ml 5 M NaCl gefällt und abzentrifugiert. Im Überstand befand sich jetzt die gelöste DNA, die durch Zugabe von 30 ml 96 %igem eiskaltem Ethanol gefällt wurde. Die deutliche sichtbare DNA wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, in 70 %igem Alkohol gewaschen und in 200–600  $\mu\text{l}$  TE-Puffer auf einem Rotator gelöst.

### 2.4.2 DNA-Aufreinigung

Wurden nach Lösen der DNA-Probe in TE Proteinrückstände detektiert oder zeigte die Photometrie Verunreinigungen an, musste die DNA gereinigt werden. Dazu wurde die DNA mit 1/10 Volumen 20 x SSC und 50  $\mu\text{g/ml}$  RNase A versetzt und über eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde ein 1/100 Volumen SDS und 10  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K zu der DNA-Probe gegeben. Über Nacht wurden die Proteine in der Probe bei  $37^{\circ}\text{C}$  verdaut. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gemischt und 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Ihr wurde ein gleiches Volumen einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) zugefügt. Die Probe wurde 15 min zentrifugiert. Die DNA befand sich jetzt in der oberen Phase und wurde mittels eines halben Volumens Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt, pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in TE-Puffer gelöst.

### DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der DNA wurde mit einem Photometer gemessen. DNA mit einer Dichte von 50 ng/ $\mu\text{l}$  besitzt bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Extinktion von 1. Die Konzentration der gemessenen DNA kann daher folgendermaßen berechnet werden:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/ml})] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } (\mu\text{g/ml})$$

Die DNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 200–300 nm gemessen. Der Quotient aus  $E_{260}$  und  $E_{280}$  ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen; er sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR nach Saiki ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren und die Basismethode für die vorliegende Arbeit (Saiki et al. 1988). Das Prinzip der PCR besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge
- Annealing (Anlagerung der Primer, variable Temperatur)
- Elongation (bei Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase)

PCR-Reaktionsansätze müssen grundsätzlich auf Eis pipettiert werden, um unspezifische Reaktionen der Taq-Polymerase zu verhindern. Dabei wird die Matrizen-DNA vorgelegt, aus den übrigen Lösungen (Puffer, Nukleotide, Taq-Polymerase, Forward- und Reverse-Primer,  $\text{H}_2\text{O}$ ) ein Reaktionsgemisch hergestellt und dieses auf die Proben verteilt. Bei jeder PCR-Reaktion ist ein Leerwert mitzuführen

(Reaktionsansatz ohne DNA-Probe), um Verunreinigungen des PCR-Reaktionsgemisches ausschließen zu können. Die PCR-Standardbedingungen werden für das jeweilige Produkt modifiziert. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR wurden in Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln durchgeführt. Die bei der PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

## PCR-Optimierung

Besondere Sorgfalt wurde auf die Auswahl der Primer für die Gene *BBS2* und *BBS4* gelegt (Tabelle 2–1, 2–2). Das verwendete Programm Primer 3 erlaubte die Einstellung zahlreicher Parameter, die die Primer für die jeweilige Anwendung (PCR, Direktsequenzierung) optimiert. Die meisten Templates konnten mit geeigneten Primerpaaren bei Standardbedingungen amplifiziert werden. Die Annealingtemperatur wurde im Hinblick auf die Spezifität und die Ausbeute des PCR-Produktes optimiert. Bei schwierigen Templates (z. B. GC-reiche Sequenzen) wurden Zusätze wie DMSO (2–15 %) und Formamid (2–10 %) eingesetzt. Alle Primer wurden auf ihre Spezifität überprüft und nur solche Primer verwendet, die mit höchstmöglicher Wahrscheinlichkeit ausschließlich an die gewünschte Sequenz im jeweiligen BBS-Gen binden. Die Durchführung des Alignments erfolgte mit Hilfe der Online Datenbank NCBI.

### 2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration der Agarose in den Gelen wurde je nach PCR-Fragmentgröße und gewünschter Trennschärfe variiert. Alle aufzutragenden Produkte (10 µl) wurden vor der Elektrophorese mit einem Gelladepuffer (2–3 µl) versetzt. Agarose ist ein Polysaccharid aus Rotalgen und liegt in Pulverform vor. Es wurde in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht und geliert beim Abkühlen. Hatte das noch flüssige Gel eine Temperatur von ca. 50 °C erreicht, wurde EtBr hinzugegeben und das Gemisch in einen mit Kämme bestückten Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämme gezogen und der Gelschlitten in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern gestellt. Bei jeder Elektrophorese wurde ein DNA-Längenstandard mitgeführt. Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

### Photodokumentation von Agarosegelen

Agarosegele wurden vor dem Gießen mit EtBr versetzt, um das PCR-Produkt unter UV-Licht sichtbar machen zu können (2 µl der EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) auf 100 ml des Agarosegels). Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert. Die Verwaltung und Auswertung der Bilder erfolgte mit E.A.S.Y.Rh3 Software (Herolab).

## 2.5 Single-stranded-conformational analysis (SSCA)

Zur Aberrationsanalyse der Kandidatengene wurde die SSCA eingesetzt (Grompe 1993). Dazu wurde denaturierte Einzelstrang-DNA auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetragen. Im Gel nimmt Einzelstrang-DNA durch Basenpaarung mit sich selbst komplexe Konformationen ein, die von der Nukleinsäuresequenz, der Temperatur und dem angelegten Spannungsgradienten abhängen. Schon eine einzige mutierte Base kann zu veränderten Laufeigenschaften des Fragments im Gel führen, oder die Anzahl der Fragmente beeinflussen. Alle DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen also in einer bestimmten Zeit eine bestimmte Laufstrecke im Gel zurück und werden auf gleicher Höhe im Gel nach Färbung sichtbar. Die Sensitivität der SSCA hängt von der Länge der PCR-Produkte ab. Sie ist am höchsten für DNA-Fragmente der Größe von 130–300 bp. Entscheidend für die Sensitivität sind auch die Position des Basenaustausches, der GC-Gehalt der Sequenz und die Art der Mutation. Weiterhin kann durch Variation der Laufbedingungen bei der Elektrophorese das Ergebnis beeinflusst werden (Sheffield et al. 1993). Das Kandidatengene wurden aus genomischer DNA über überlappende PCR-Produkte von maximal 350 bp amplifiziert. Die Proben wurden mit Formamid-haltigem SSCA-Ladepuffer versetzt, denaturiert und danach auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel (12 %) aufgetragen. Die SSCA-Bedingungen wurden für jedes einzelne PCR-Produkt optimiert. Dazu wurden die aufgetragene DNA-Menge, die angelegte Spannung und die Laufzeit individuell variiert. Die Elektrophorese wurde bei zwei Temperaturen durchgeführt, 20 °C und 10 °C. Das Screening der DNA wurde bei der Temperatur durchgeführt, die auf dem SSCA-Gel die deutlichste Darstellung der



DNA-Fragmente hervorbrachte. Der Verdacht auf Sequenzvarianten äußerte sich in Form von unterschiedlichem Laufverhalten der DNA-Einzelstränge oder DNA-Doppelstränge.

Anschließend wurde eine Silberfärbung der DNA-Fragmente durchgeführt. Je nachdem, ob es sich beim Träger um eine homozygot oder eine heterozygot vorliegende Sequenzvariante handelt, waren entweder beide DNA-Fragmente (beide Allele, keine Wildtypbanden, auftretende Banden zeigen ein anderes Laufverhalten) oder nur ein DNA-Fragment (eines der beiden Allele, neben den Wildtypbanden tauchen zusätzliche Banden auf) different zu den Wildtyp-DNA-Fragmenten. Die so gefärbten Gele wurden in Folie verpackt und getrocknet. Sie sind auf diese Weise dauerhaft haltbar.

## Silberfärbung

Bei der Silberfärbung lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste in den PCR-Amplifikaten an. Durch das Formaldehyd, das in der Entwicklerlösung enthalten ist, werden die Silberionen reduziert und anschließend mit Natriumcarbonat gefällt. Das PAA-Gel wird so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die DNA-Fragmente die gewünschte Farbintensität zeigen. Durch Einlegen des PAA-Gels in den Fixierer (Essigsäure) wird die Reaktion abgestoppt (Budowle et al. 1991).

- 10 % Ethanol 5 min
- 1 % Salpetersäure 5 min
- H<sub>2</sub>O 1 x kurz spülen
- Silbernitrat-Lösung 30 min
- H<sub>2</sub>O 2 x gründlich spülen
- Entwickler in der Lösung bewegen, bis sich Fragmente zeigen
- Fixierer (100 ml Ethanol, 29 ml Glycerol 87 %) 2 min
- H<sub>2</sub>O 1 x 2 min spülen
- Konservierer (5 % Glycerol, 10 % Ethanol) mindestens 30 min

### Lösungen:

0,038 % Formaldehyd

Fixierer 10 % Essigsäure

Silbernitrat-Lösung 12 mM AgNO<sub>3</sub>

Entwickler 0,14 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

## 2.6 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Basenabfolge in einem DNA-Abschnitt genau zu bestimmen, bedient man sich heutzutage vor allem der enzymatischen Sequenziermethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Im Reaktionsansatz befinden sich das zu sequenzierende PCR-Produkt, der passende Forward- oder Reverse-Primer (es wird jeweils nur ein Strang sequenziert), die Polymerase und 2'-Desoxynukleotide. Die Elongation der Fragmente erfolgt durch die Taq-Polymerase, der DNA-Synthese-Start durch den jeweiligen zugegebenen Primer. In einem bestimmten Verhältnis werden 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. Da die ddNTPs in Position 3 ein H-Atom anstelle der üblichen OH-Gruppe besitzen, bewirken sie an dieser Stelle einen Kettenabbruch. Für das System, mit dem in dieser Untersuchung gearbeitet wurde, wurden die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Man spricht deshalb auch von dem Fluoreszenz-Terminator-System. Während der Polymerisierungsreaktion werden die 2'-3'-ddNTPs in den replizierten DNA-Strang eingebaut. Dadurch entstehen Oligonukleotidstränge unterschiedlicher Länge, die durch den basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff der letzteingebauten Base gekennzeichnet sind. Mit Hilfe eines denaturierenden Harnstoffgels wurden die Stränge nach ihrer Größe getrennt. Die farbcodierten End-Nukleotide können der Reihe nach abgelesen werden und ergeben so die Sequenz des Vorlagen-Stranges. Zur Sequenzreaktion wird der Big Dye® Terminator-Mix von Applied Biosystems eingesetzt, der Taq-Polymerase, Puffer, unmarkierte dNTPs und markierte ddNTPs enthält.

## Vorbereitung der Proben

Im Rahmen der Arbeit wurden PCR-Produkte direkt nach Amplifikation und Reinigung sequenziert. Die Aufreinigung der Proben erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit® von Qiagen gemäß den Anleitungen des Herstellers. Primer- und Enzymreste sowie Salze werden dabei aus dem PCR-Ansatz entfernt, indem das PCR-Produkt mit einem Ethanol-haltigen Puffer versetzt auf eine Säule gegeben, durch mehrere Zentrifugationsschritte gereinigt und schließlich in H<sub>2</sub>O oder Elutionspuffer gelöst wird. Alternativ wurden allelspezifische Sequenzierungen durchgeführt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Fragmente aus dem gefärbten, getrockneten SSCA-Gel ausgestochen. Sie wurden über Nacht bei 4 °C in 50–100 µl HPLC-Wasser gelöst. Da die DNA-Mengen gering waren, wurde eine Reamplifikations-PCR durchgeführt. Nach der Kontrolle der Amplifikation auf einem 2 %igen Agarose-Gel wurde vor der Sequenzierung auch dieses Reamplifikationsprodukt wie oben beschrieben aufgereinigt.

## Sequenzreaktion

Für diesen Schritt wurde der Big Dye® Terminator Mix von Applied Biosystems verwendet. Um Fluoreszenzverluste zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte im Dunkeln ausgeführt. Der Sequenzansatz wurde auf Eis pipettiert. Er bestand aus max. 5 µl DNA (50–100 ng), 1 µl Forward-/Reverse-Primer (50 bzw. 100 pmol/µl), 4 µl Big Dye® Terminator Mix und H<sub>2</sub>O ad 10 µl. Die standardmäßige Sequenzreaktion begann mit einer initialen Denaturierung (3 min/96 °C). Es folgten 25 Zyklen mit Denaturierung (10 sec/96 °C), Hybridisierung (5 sec/primerspezifische Temperatur) und Synthese (4 min/60 °C). Abschließend wurde auf 4 °C gekühlt. Zur Fällung wurden 10 µl des Sequenzansatzes mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 80 µl Ethanol (100 %ig) versetzt und 20 min bei –20 °C inkubiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgezogen. Der Niederschlag wurde in 500 µl Ethanol (70 %ig) gewaschen und für 10 min bei 1.400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgezogen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und direkt auf das Sequenzgel geladen oder bei –20 °C gelagert.

## Herstellung eines Sequenzgels

Für die elektrophoretische Auftrennung der markierten Proben wurde ein 6 %iges PAA-Gel verwendet. Dieses trennt optimal Fragmente zwischen 25 und 400 Nukleotiden. Die Gellösung setzte sich aus 18 g Harnstoff, 26 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml 10 x TBE, 5 ml Hydrolink Long Ranger, 250 µl APS und 35 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) zusammen. Vor Zugabe von APS und TEMED wurde der Harnstoff im Wasserbad bei 50 °C gelöst und die Lösung filtriert. Anschließend wurde sie zügig und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der TOP-Spacer eingesetzt. Die Polymerisierung dauerte eine Stunde.

## Sequenzanalyse

Das Sequenzgel wurde nach der Polymerisierung in den ABI 373 Sequencer eingespannt. Die obere Pufferkammer wurde mit 1 x TBE gefüllt und der Zahnkamm eingesetzt, sodass er ca. 1 mm in das Gel hineinragt. Den Proben wird 1,5–3,5 µl Ladepuffer je nach Kammart (5:1 deionisiertes Formamid zu 50 mM EDTA) zugesetzt. Es wurde zuerst nur jede zweite Geltasche geladen und nach zweiminütigem Vorlauf die übrigen. Die Elektrophorese erfolgte je nach Produktgröße (ca. 100 bp/h) bei 37 Watt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit der DNA Sequencing Software, Version 2.1.1 von Perkin Elmer, USA. Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurde das Programm Sequence Navigator, Version 1.0 (Applied Biosystems) verwendet.

### 3 Patienten und Kontrollpersonen

#### 3.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden die Blutproben von 65 BBS-Patienten untersucht. Die Proben wurden von niedergelassenen Ärzten, Kliniken und der Selbsthilfegruppe Pro Retina Deutschland an das Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg gesandt. Alle Patienten wurden bezüglich der Studienziele mit einem Informationsblatt aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis an dieser Studie teilzunehmen. Der Studienaufbau wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg überprüft und anerkannt (134/01).

#### Kontrollen

Als Kontrollgruppe dienten 100 anonymisierte DNA-Proben von nicht miteinander verwandten männlichen und weiblichen in Deutschland lebenden Personen.

#### Daten zum Patientenkollektiv

Die Gesamtzahl der BBS-Patienten betrug  $n=65$  (Tabelle 3-1). Insgesamt gab es 15 Familien mit einem erkrankten Kind ohne Geschwister, 21 Familien mit einem erkrankten Kind und gesunden Geschwistern, sieben Familien mit zwei und eine Familie mit drei erkrankten Kindern, sowie zwölf Patienten ohne DNA-Proben von den Angehörigen. Insgesamt standen DNA-Proben von 192 Familienmitgliedern für diese Studie zur Verfügung. Der überwiegende Teil der BBS-Familien stammt aus der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. Acht Familien waren türkischer Abstammung. Unter allen Eltern waren sieben blutsverwandt, darunter sechs türkische und eine deutsche Familie. Zum Zeitpunkt dieser Studie waren alle Patienten kinderlos.

**Tabelle 3-1: Patientenkollektiv für die molekulargenetische Analyse der *BBS2*- und *BBS4*-Gene**

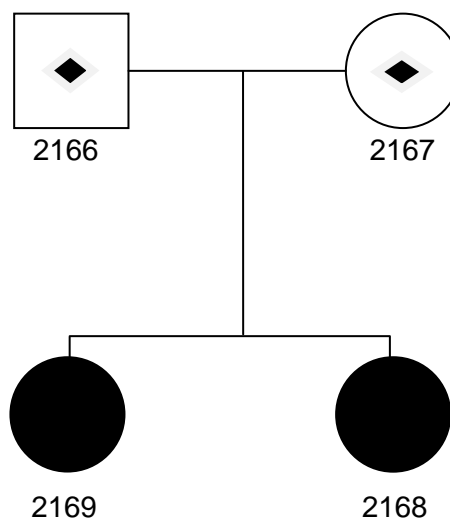
Patientenkollektiv	Anzahl	Geschlecht	Herkunft
Patienten	65	♀ 28    ♂ 37	57 deutsche, 8 türkische BBS-Patienten
Geschwister ohne BBS	21		
Väter	53		
Mütter	53		

### 3.2 Kasuistik der Familie 2053

Die Familie 2053 stellte sich zur humangenetischen Beratung im Zentrum für Humangenetik in Marburg vor. Der Phäno- und Genotyp der Familienmitglieder wird in dieser Kasuistik detailliert erläutert und soll als Beispiel den autosomal-rezessiven Erbgang zeigen. Zusätzlich können Überlegungen zu einer digen-triallelischen Vererbung gemacht werden.

Alle Familienmitglieder (Abbildung 3–1) waren persönlich anwesend. Sämtliche Informationen stammen aus der Anamnese und klinischen Untersuchung der Familie während der genetischen Beratung und den im Vorfeld bekannten Angaben aus einem Anamnesefragebogen.

Die Familie 2053 kommt aus einem kleinen Dorf in Mittelhessen. Eine Verwandtschaft der Eltern ist nicht bekannt. Die Eltern des Vaters sind, genau wie seine beiden Geschwister, klinisch gesund. Die Eltern der Mutter sind ebenfalls beide klinisch gesund. Sie hat keine Geschwister. Das BBS ist zuvor in der Familie nicht aufgetreten.



**Abbildung 3–1: Stammbaum der Familie 2053.** Die Eltern sind gesund. Die Schwestern 2169 und 2168 sind an BBS erkrankt.

### Die Schwester 2169

Die Schwester 2169 war zu dem Zeitpunkt der Vorstellung in der humangenetischen Beratungsstelle 19 Jahre alt. Bei der Geburt wurde eine postaxiale Polydaktylie an der linken Hand und am linken Fuß diagnostiziert. Der überzählige Finger und die Zehe waren von knöcherner Struktur und wurden im Alter von ca. 12 Monaten operativ abgetragen. An der Hand waren deutlich die Narben des Eingriffs zu erkennen. Am Fuß war ein zweiter operativer Eingriff zur kosmetischen Korrektur des kleinen Zehs notwendig. Auch hier waren die Narben deutlich sichtbar (Abbildung 3–2).

Im Alter von 5 Jahren (im Jahr 1990) wurde in der Augenklinik Heidelberg eine Retinitis pigmentosa im Anfangsstadium diagnostiziert und erstmals die Verdachtsdiagnose eines BBS geäußert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung (2003) war Patientin 2169 aufgrund der fortschreitenden Sehinderung ein Grad der Behinderung (GdB) von 80 % zugesprochen. Sie benötigt spezielle Hilfsmittel am Arbeitsplatz, wie übergroße Monitore und Vergrößerungssoftware.

Aus einer Körpergröße von 174 cm und einem Gewicht von 70 kg errechnete sich für Patientin 2169 ein Body Mass Index (BMI) von 23. Gemäß der WHO-Klassifikation für Adipositas hatte Patientin 2169 Normalgewicht.

Nierenerkrankungen oder komplexe urogenitale Fehlbildungen lagen weder zum Zeitpunkt der Geburt noch bei der Vorstellung im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg vor.



**Abbildung 3–2: Hände und Füße der Patientin 2169.**

An der linken Hand und am linken Fuß sind deutlich die Fehlstellungen am 5. Strahl bei Zustand nach postaxialer Polydaktylie zu erkennen.

Ihre Kiefer waren zu klein gewachsen, daher kam es zu Zahnfellstellungen. Im Alter von 12 Jahren bekam Patientin 2169 für 2,5 Jahre eine feste Zahnsperre. Über Schwerhörigkeit, Herzfehler, Diabetes mellitus oder Leberfunktionsstörungen wurde nicht berichtet.

Patientin 2169 hatte das Fachabitur erfolgreich abgeschlossen. Anschließend begann sie eine Lehre zur Verwaltungsfachangestellten.

### **Die Schwester 2168**

Die Schwester 2168 war zum Zeitpunkt der Vorstellung in der humangenetischen Beratungsstelle 13 Jahre alt. Bei der Geburt wurde eine postaxiale Polydaktylie an beiden Händen diagnostiziert. Die überzähligen Finger waren von knorpeliger Struktur und wurden unmittelbar nach der Geburt operativ abgetragen (Abbildung 3–3).

Im Alter von 6 Jahren (im Jahr 1997) wurde von Ärzten der Augenklinik Tübingen erstmals eine Retinitis pigmentosa diagnostiziert. Die Präsenz zweier Kardinalsymptome des BBS – Polydaktylie und Retinitis pigmentosa – führte zur Diagnosestellung. Zum Zeitpunkt der Vorstellung im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg lag ihr Sehvermögen bei 50 %.

Aus einer Körpergröße von 170 cm und einem Gewicht von 70 kg errechnete sich für Patientin 2168 ein BMI von 24. Gemäß der WHO-Klassifikation für Adipositas hatte Patientin 2168 Normalgewicht.

Nierenerkrankungen oder komplexe urogenitale Fehlbildungen lagen weder zum Zeitpunkt der Geburt noch bei der Vorstellung im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg vor.



**Abbildung 3-3: Hände und Füße der Patienten 2168.** In der Abbildung ist die leicht konische und kurze Fingerform erkennbar. Die Füße zeigen keine Auffälligkeit. Die Operationsmnarben der Polydaktylieabtragung am 5. Strahl beider Hände sind auf diesem Bild nicht sichtbar.

Die sprachliche Entwicklung von Patientin 2168 galt ab dem Schulalter als verzögert. Im Verlauf der ersten Schuljahre wurden Lernschwierigkeiten deutlich und der Besuch einer Sprachheilschule notwendig. Patientin 2168 besuchte zum Zeitpunkt der Vorstellung im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg die 5. Klasse einer Gesamtschule. Ab dem 6. Schuljahr sollte sie auf eine Hauptschule wechseln. Die Patientin gab Mathematik neben Geographie, Kunst und Musik als ihr Lieblingsfach an.

Die koordinatorischen und feinmotorischen Fähigkeiten der Patientin 2168 sind defizitär. Laut Eltern hatte sie bereits im Kindergarten Schwierigkeiten mit dem Ausschneiden von Objekten. Deutlich wurde das feinmotorische Defizit auch beim Ankleiden. Bei kleineren Knöpfen war sie auf fremde Hilfe angewiesen. Sie beschrieb zudem Gleichgewichtsstörungen, die sich vor allem im Sportunterricht bemerkbar machten.

Im Alter von 6 Jahren wurde ein Strabismus festgestellt. Eine Zahnfellstellung wurde mit einer festen Zahnsperre behoben. Über Schwerhörigkeit, Herzfehler, Diabetes mellitus oder Leberfunktionsstörungen wurde nicht berichtet.

Die Beteiligung von Patientin 2168 an dem Beratungsgespräch und der Anamnese war sehr zurückhaltend. Ihre Antworten stets einsilbig. Es entstand jedoch nicht der Eindruck, dass es ihr Schwierigkeiten bereitete der Unterhaltung zu folgen. Die Mutter berichtete, dass Patientin 2168 auch zuhause sehr wenig und leise rede. Für Antworten benötigte sie auffällig lange Bedenkzeiten. Ihr Mund stand häufig leicht offen.

### Vergleich des Phänotyps der Schwestern 2169 und 2168

Die phänotypische Ausprägung der Leitsymptome des BBS war zwischen den Schwestern deutlich unterschiedlich (Tabelle 3-2). Patientin 2168 zeigte, im Vergleich zu ihrer älteren Schwester 2169, ein für das BBS ausgeprägteres Phänotyp. Drei Hauptkriterien und sechs Nebenkriterien waren positiv (Tabelle 3-2). Die Diagnosekriterien des BBS von Beales und Mitarbeitern (1999) waren erfüllt. Bei Patientin 2169 sind zwei Hauptkriterien und ein Nebenkriterium positiv. Die Diagnosekriterien von Beales und Mitarbeitern (1999) waren nicht erfüllt.

**Tabelle 3-2: Phänotypische Ausprägung der Diagnosekriterien des BBS der Schwestern 2169 und 2168.** + = phänotypische Ausprägung des Kriteriums.

Hauptkriterien	Schwester 2169	Schwester 2168
Retinitis pigmentosa	+	+
postaxiale Polydaktylie	+	+
Adipositas	-	-
mentale Retardierung	-	+
renale Dysfunktion	-	-
Nebenkriterien		
Sprachdefizit	-	+
Strabismus / Katarakt / Astigmatismus	-	+
Brachydaktylie / Syndaktylie	-	+
Entwicklungsverzögerung	-	+
Diabetes mellitus / insipidus	-	-
Ataxie / Koordinationsstörungen	-	+
Milde Spastik der unteren Extremität	-	-
Gesichtsdeformationen	-	-
Zahnabnormalitäten	+	+
Hyper-/ Hypodontismus	-	-
Herzfehler	-	-



### Molekulargenetische Analyse des *BBS1*-Gens der Familie 2053

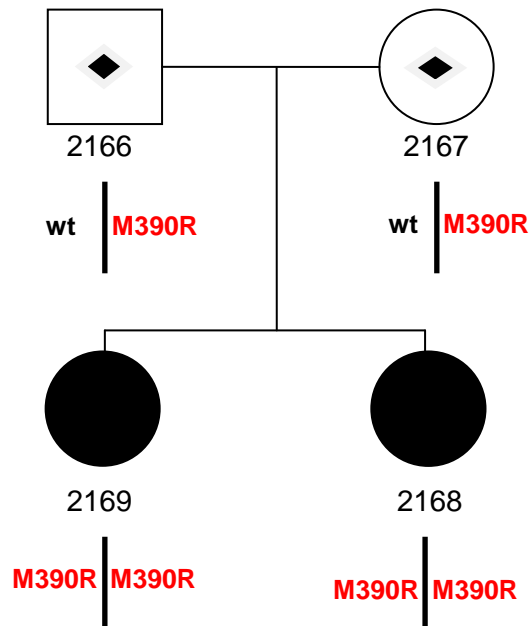


Abbildung 3–4: Stammbaum der Familie 2053 mit den Ergebnissen der *BBS1*-Genotypisierung im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik am Institut für Humangenetik Marburg. wt = Wildtyp, M390R = Mutation in *BBS1* Exon 12.

Der Stammbaum der Familie 2053 (Abbildung 3–4) veranschaulicht den heterozygoten Trägerstatus der Eltern für die Mutation p.M390R in *BBS1*. Sowohl der Vater als auch die Mutter zeigten keine klinischen Merkmale des BBS. Die Schwestern 2169 und 2168 waren beide homozygot für p.M390R im *BBS1* (Meyer 2009; Claus 2008). Der homozygote p.M390R-Genotyp war in diesem Fall krankheitsauslösend.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekulargenetische Analysen des *BBS2*-Gens

Zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung dieser Arbeit war die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in der Routinediagnostik noch nicht Standard. Daher wurden die DNA-Proben von 65 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten unter Verwendung der SSCA untersucht. Im Vergleich zur direkten Sequenzanalyse ist die SSCA eine reine Suchmethodik mit eingeschränkter Genauigkeit. Es wurden nur die Exone untersucht, in denen Mutationen in der internationalen Literatur beschrieben worden waren und daher die Wahrscheinlichkeit in diesen Exonen eine Mutation zu finden, vermutlich am höchsten ist. Im *BBS2*-Gen waren es 13 Exone (Exone 1–6, 8–10, 12 und 14–16). Ausgewertet wurde die Analyse über das Laufverhalten der DNA-Fragmente im PAA-Gel. Bei einem aberranten Laufverhalten der DNA-Fragmente wurden die DNA-Proben der Familienangehörigen des betroffenen Patienten ebenfalls analysiert.

#### 4.1.1 Amplifizierung der Exone des *BBS2*-Gens

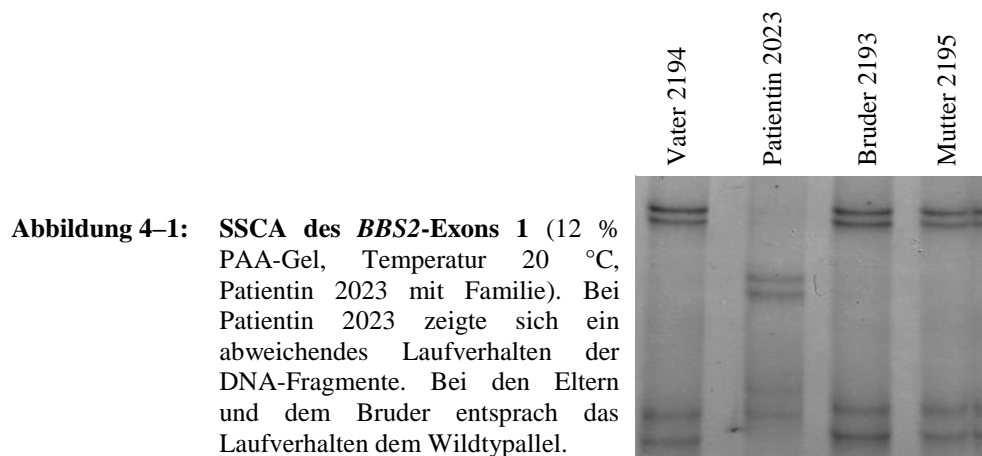
Die Primer für die PCR-Amplifikation der *BBS2*-Exone 1, 3–6, 9, 12 und 14–16 wurden aus der Arbeit von Nishimura und Mitarbeitern (2001) übernommen. Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese mit einem Längenstandard überprüft. Zu berücksichtigen war, dass mit den Primerpaaren aus der Arbeit von Nishimura und Mitarbeiter (2001), die PCR-Produkte der Exone 2, 8 und 10 für die SSCA größer als 250 bp sein würden. Die ideale Produktgröße für die SSCA liegt aber bei maximal 250 bp. Aus diesem Grund wurden unter Verwendung der Software Primer 3 Primerpaare für zwei sich überlappende Fragmente dieser Exons entworfen. Bei der Amplifikation entstanden so von jedem Exon zwei DNA-Fragmente mit einer optimalen Größe: Exon 2a (249 bp), 2b (248 bp), 8a (250 bp) und 8b (200 bp). Die Fragmentgröße des Exon 10 wurde durch die Verwendung der Software Primer 3 neu ermittelter Primer auf 233 bp verringert. Die Annealingtemperaturen der jeweiligen PCR sind Tabelle 2-2 zu entnehmen.

#### 4.1.2 SSCA zur Fragmentlängen- und Konformationsanalyse im *BBS2*-Gen

Im Folgenden sind alle in der SSCA aberranten DNA-Fragmente (Tabelle 4-2) dargestellt.

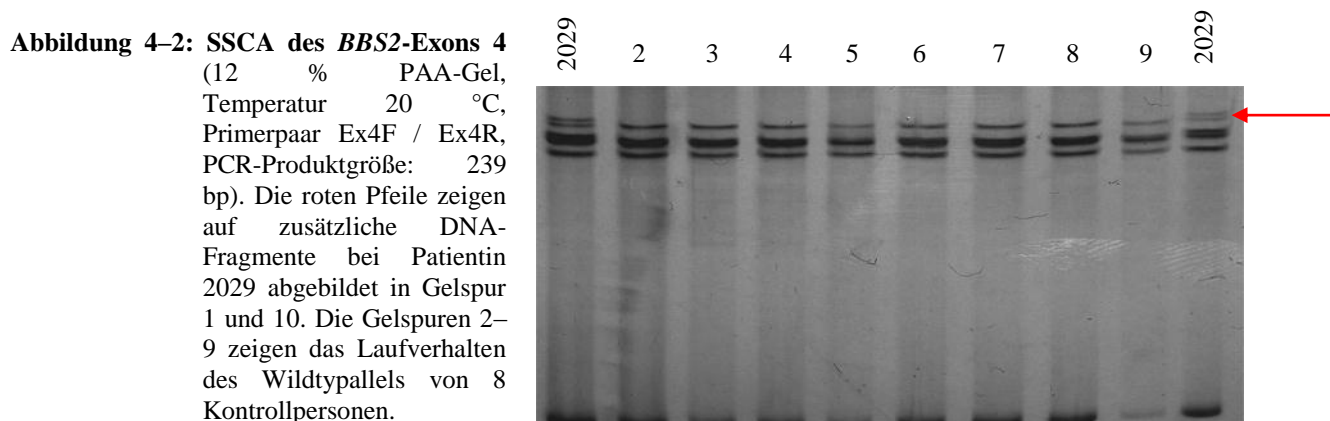
##### ***BBS2*-Exon 1: Primerpaar Ex1F / Ex1R**

Das PCR-Produkt der DNA der Patientin 2023 zeigte im Vergleich zu den Kontrollpatienten ein abweichendes Muster der DNA-Fragmente. Zur weiteren Analyse der Aberrationen bei Patientin 2023 (♀, Geschwister, der Bruder 2193 war gesund) wurden die Familienmitglieder 2194, 2193 und 2195 untersucht (Abbildung 4-1).



##### ***BBS2*-Exon 4: Primerpaar Ex4F / Ex4R**

Abbildung 4-2 zeigt die SSCA der DNA-Fragmente von Patientin 2029 und acht Kontrollpersonen mit dem Primerpaar Ex4F / Ex4R. Das PCR-Produkt der DNA der Patientin 2029 (♀, Einzelkind) zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen ein abweichendes Muster der DNA-Fragmente (Abbildung 4-2). Die DNA ihrer Familie stand zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Daher konnte keine Segregationsanalyse erfolgen.

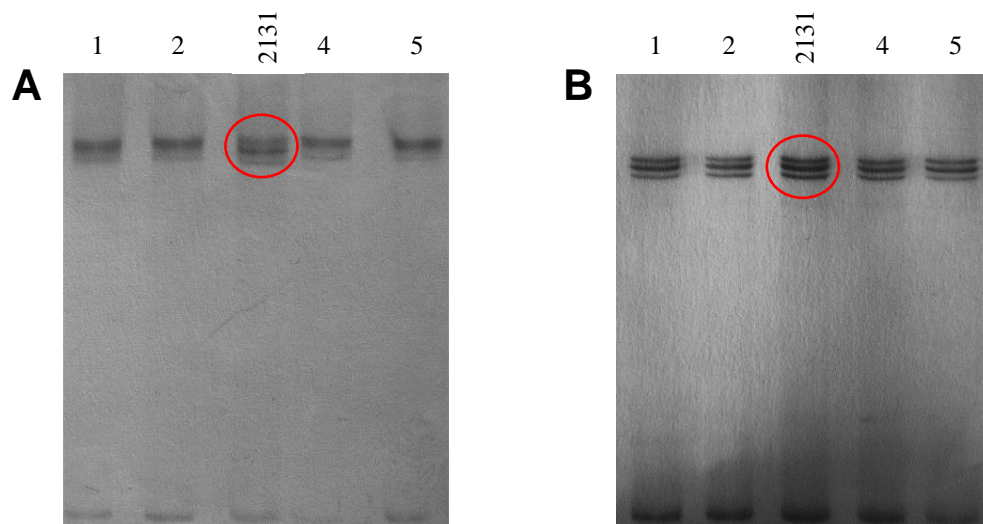


**BBS2-Exon 10: Primerpaar Ex10-15F / Ex10-364R**

In Abbildung 4–3A ist die SSCA der DNA-Fragmente von Patient 2131 und vier Kontrollpersonen mit der Primerkombination Ex10-15F / Ex10-364R dargestellt. Das PCR-Produkt der DNA von Patient 2131 (♂, Geschwister, der Bruder 2130 und die Schwester 2132 sind gesund) zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen ein abweichendes Muster der DNA-Fragmente (Abbildung 4–3A). Aufgrund der wiederholten Unschärfe in der Darstellung der DNA-Fragmente wurde mittels der Software Primer 3 ein weitere Primerkombination für *BBS2*-Exon 10 (Ex10-132F / Ex10-364R) ermittelt und eine erneute SSCA durchgeführt (Abbildung 4–3B).

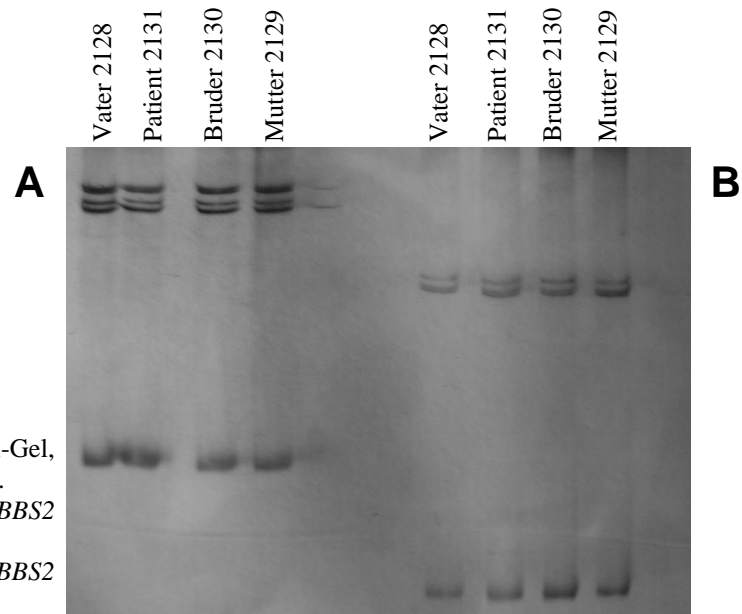
**BBS2-Exon 10: Primerpaar Ex10-132F / Ex10-364R**

In Abbildung 4–3B ist die SSCA der DNA-Fragmente von Patient 2131 und vier Kontrollpersonen mit der Primerkombination Ex10-132F / Ex10-364R dargestellt.



**Abbildung 4–3: SSCA des *BBS2*-Exons 10** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C) A = Primerkombination *BBS2* Ex10-15F / *BBS2* Ex10-364R (PCR-Produktgröße: 349 bp). B = Primerkombination *BBS2* Ex10-132F / *BBS2* Ex10-364R (PCR-Produktgröße: 232 bp). Die DNA-Fragmente von Patient 2131 sind mit roten Kreisen gekennzeichnet. Die Ergebnisse in Abbildung A lassen eine Aberration vermuten, die sich in Abbildung B nicht zeigt. Die Gelspuren 1–2 und 4–5 beider Abbildungen zeigen das Laufverhalten des Wildtypallels von vier Kontrollpersonen.

Die Segregationsanalyse der Familie des Patienten 2131 (Vater 2128, Bruder 2130, Schwester 2132, Mutter 2129) zeigte kein Hinweis für eine Aberration bei den Eltern, dem Patienten oder seinem Bruder (Abbildung 4–4).



**Abbildung 4-4:**

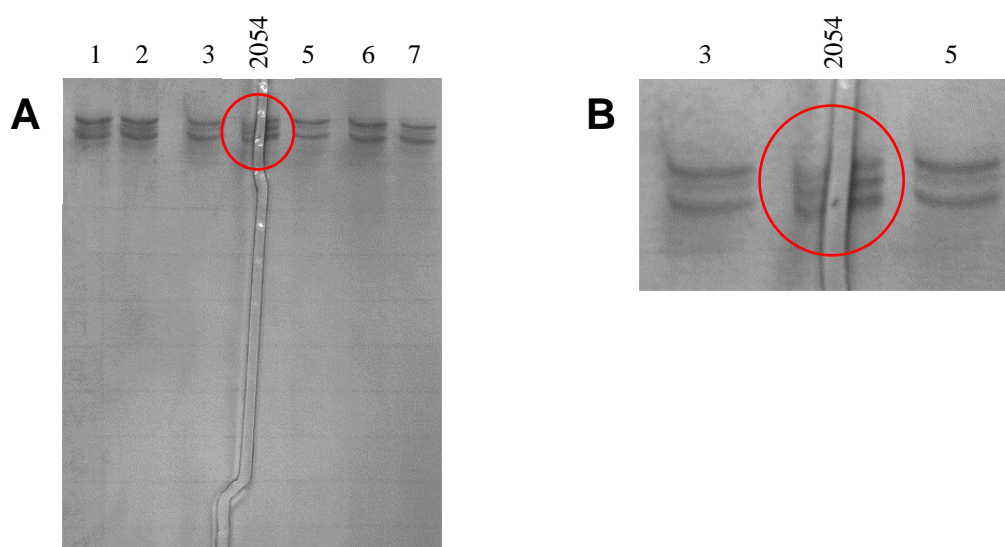
**SSCA des *BBS2*-Exons 10** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C, Patient 2131 mit Familie.

A = Primerkombination *BBS2* Ex10-15F / *BBS2* Ex10-364R (PCR-Produktgröße 349 bp).

B = Primerkombination *BBS2* Ex10-132F / *BBS2* Ex10-364R (PCR-Produktgröße 232 bp).

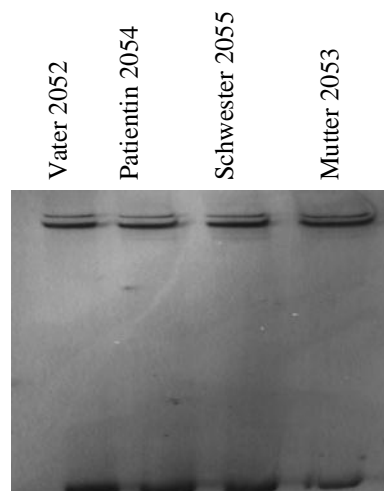
**BBS2-Exon 12: Primerpaar Ex12F / Ex12R**

Abbildung 4–5 zeigt die SSCA der DNA-Fragmente von Patientin 2054 und sechs Kontrollpersonen mit dem Primerpaar Ex12F / Ex12R. Das PCR-Produkt der DNA von Patientin 2054 (♀, Geschwister, die Schwester 2055 ist erkrankt) zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen ein abweichendes Muster der DNA-Fragmente (Abbildung 4–5A). In Abbildung 4–5B ist eine Vergrößerung der Gelspuren 3–5 dargestellt, da ein Riss im PAA-Gel die Beurteilung der DNA-Fragmente erschwert.



**Abbildung 4–5: SSCA des *BBS2*-Exons 12** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C, Primerpaar Ex12F / Ex12R, PCR-Produktgröße: 344 bp). A = Auffälligkeit der DNA-Fragmente der Patientin 2054. Innerhalb der roten Markierung ist ein stärker ausgeprägtes mittleres DNA-Fragment erkennbar. Die Gelspuren 1–3 und 5–7 zeigen das Laufverhalten des Wildtypallels von sechs Kontrollpersonen. B = Vergrößerter Ausschnitt der Gelspuren 3–5. In beiden Abbildungen zeigt sich ein vertikaler Riss durch das Gel.

Die Analyse der Familienmitglieder der Patientin 2054 (Vater 2052, Schwester 2055, Mutter 2053) zeigte kein Hinweis für eine Aberration bei den Eltern oder der Schwester (Abbildung 4-6). Eine Aberration des DNA-Fragmentes von Patientin 2054 konnte in der Segrationsanalyse nicht bestätigt werden.

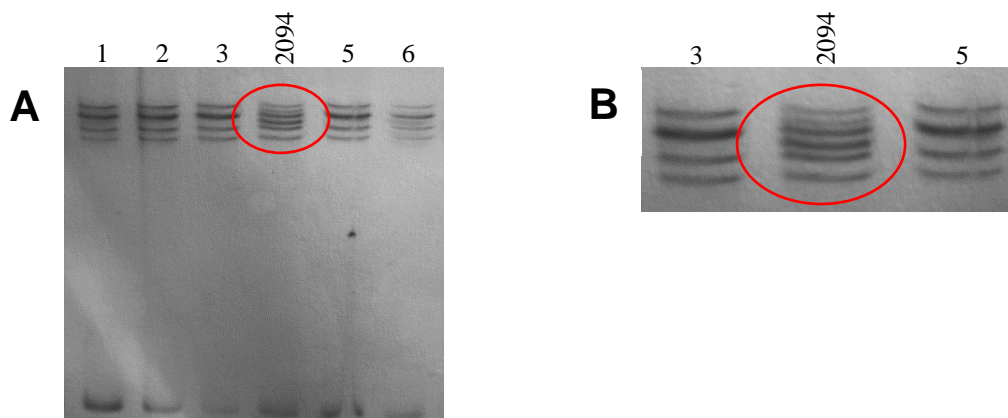


**Abbildung 4-6:**

**SSCA des *BBS2*-Exons 12** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C, Patientin 2054 mit Familie). Es zeigte sich kein Hinweis auf eine Aberration.

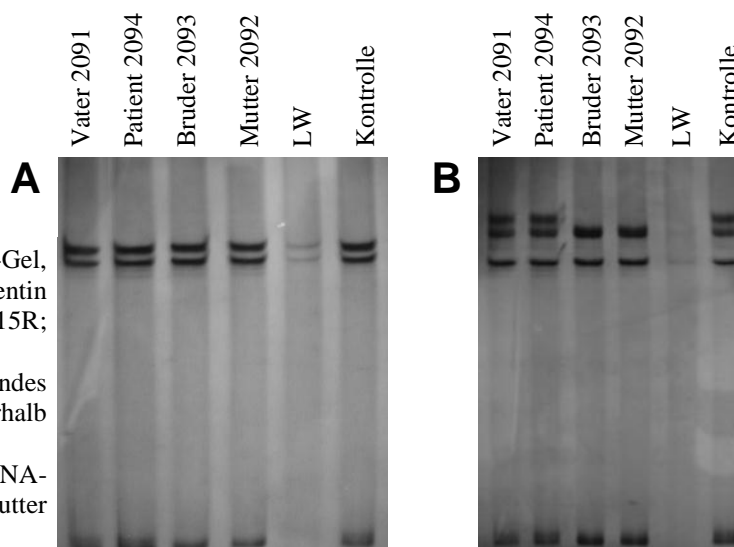
### **BBS2-Exon 15: Primerpaar Ex15F / Ex15R**

Abbildung 4–7A zeigt die SSCA der DNA-Fragmente von Patientin 2094 und 5 Kontrollpersonen mit dem Primerpaar Ex15F / Ex15R. Das PCR-Produkt der DNA der Patientin 2094 (♀, Geschwister, der Bruder 2093 ist gesund) zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen ein abweichendes Muster der DNA-Fragmente (Abbildung 4–7A). Abbildung 4–7B zeigt die Vergrößerung der Gelspuren 3–5.



**Abbildung 4-7: SSCA des BBS2-Exons 15** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C, Primerpaar Ex15F / Ex15R, PCR-Produktgröße: 330 bp). A = Auffälligkeit der DNA-Fragmente der Patientin 2094 in Exon 15. Innerhalb der roten Markierung sind zwei zusätzliche DNA-Fragmente erkennbar. Die Gelspuren 1–3 und 5–6 zeigen das Laufverhalten des Wildtypallels von fünf Kontrollpersonen in BBS2 Exon 15. B = Vergrößerter Ausschnitt der Gelspuren 3–5.

Abbildung 4–8 zeigt die Segregationsanalyse der Patientin 2094 mit Familie bei zwei Temperaturen. Es zeigt sich ein voneinander abweichendes Ergebnis. Daher wurden die DNA-Proben von Patientin 2094 und die der Familie sequenziert (Tabelle 4-4).



**Abbildung 4-8:**

**SSCA des BBS2 Exons 15** (12 % PAA-Gel, Temperatur A: 20 °C, B: 10 °C, Patientin 2094 mit Familie. Primerpaar Ex15F / Ex15R; LW = Leerwert.

A = Bei 20 °C zeigte sich kein abweichendes Laufverhalten der DNA-Fragmente innerhalb der Familie.

B = Bei 10 °C zeigte sich ein fehlendes DNA-Fragment bei dem Bruder 2093 und der Mutter 2092 im Vergleich zur Kontrolle.

### 4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der SSCA des *BBS2*-Gens

Bei einigen Patienten konnte trotz eines sichtbaren PCR-Produkts auf dem Agarosegel wiederholt keine DNA auf den 12 % PAA-Gelen dargestellt werden (Tabelle 4-1). Daher umfasste die Analyse des Exons 1 n = 61 Patienten, des Exons 2a n = 62 Patienten, der Exons 6 und 8b n = 64 Patienten. Für die Exons 2b, 3–5, 7, 8a, 9–10, 12 und 14–16 konnten alle 65 Patienten analysiert werden (Tabelle 4–1).

**Tabelle 4–1: Anzahl der mit der SSCA untersuchten *BBS2*-Gene**

Exon	Gen	Anzahl der analysierten Patienten	DNA Nummer der nicht analysierten Patienten
1	<i>BBS2</i>	n = 61	2065, 2109, 2138, 2159
2a	<i>BBS2</i>	n = 62	2017, 2095, 2178
6	<i>BBS2</i>	n = 64	2160
8b	<i>BBS2</i>	n = 64	2147
2b, 3–5, 7, 8a, 9–10, 12, 14–16	<i>BBS2</i>	n = 65	-

Für die Exons 1, 4, 10, 12 und 15 zeigte sich jeweils bei einem Patienten ein auffälliges DNA-Fragment in der SSCA (Tabelle 4–2). Bei den Exons 3, 5, 6, 8, 9, 14 und 16 zeigten sich keine Abweichungen im Laufverhalten der DNA-Fragmente der Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen.

**Tabelle 4-2: Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse für das *BBS2*-Gen.** F = Forward primer, R = Reverse primer.

Patient	Exon	Gen	Anzahl auffälliger Patienten-DNA	Art der Auffälligkeit	Primerkombination
2023	1	<i>BBS2</i>	n = 1/61	Aberration	Ex1F / Ex1R
2029	4	<i>BBS2</i>	n = 1/65	Aberration	Ex4F / Ex4R
2131	10	<i>BBS2</i>	n = 1/65	Aberration	Ex10-15F / Ex10-364R
2054	12	<i>BBS2</i>	n = 1/65	Aberration	Ex12F / Ex12R
2094	15	<i>BBS2</i>	n = 1/65	Aberration	Ex15F / Ex15R



#### 4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Segregationsanalyse in *BBS2*

Das auffällige Laufverhalten der DNA-Fragmente in der SSCA der Patienten aus Tabelle 4–2 konnte in der zweiten Untersuchung für die Patientinnen 2131 und 2054 nicht bestätigt werden (Tabelle 4–3). Daher wurde die DNA der Patientin 2131 und ihrer Familienmitglieder nicht sequenziert. Das PCR-Produkt der DNA der Patientin 2054 zeigte im Rahmen des Screenings ohne Familienmitglieder zweifach eine deutliche Abweichung im Vergleich zu den Kontrollpatienten (Abbildung 4–5). In der Segregationsanalyse konnte die Abweichung allerdings nicht erneut bestätigt werden (Abbildung 4–6).

Aufgrund des zweifachen Nachweises einer Aberration, wurde die DNA der Patientin 2054 und ihrer Familienmitglieder sequenziert.

Die Aberrationen in der SSCA der Patienten 2023 und 2094 konnten in der Segregationsanalyse bestätigt werden. Die PCR-Produkte der aberranten *BBS2*-DNA dieser Patienten und die ihrer Familienmitglieder wurden daher sequenziert. Zusätzlich wurde das PCR-Produkt des Exons 4 der *BBS2*-DNA von Patientin 2029 sequenziert. Patientin 2029 ist ein Einzelkind. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit stand keine DNA der Familienmitglieder zur Verfügung.

**Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Segregationsanalysen in *BBS2*.** Bei wiederholt nachgewiesenen Aberrationen in der SSCA wurde das PCR-Produkt der DNA sequenziert. (+ = Sequenzanalyse durchgeführt).

Patient	Anzahl der Geschwister	Exon	Gen	Ergebnis der Segregationsanalyse	Sequenzanalyse
2023 ♀	Geschwister, Bruder ist gesund	1	<i>BBS2</i>	<b>Aberration</b>	+
2029 ♀	Einzelkind	4	<i>BBS2</i>	keine Familienmitglieder	+
2131 ♂	drei Geschwister, Bruder und Schwester sind gesund	10	<i>BBS2</i>	keine Aberration	-
2054 ♀	Geschwister, beide erkrankt	12	<i>BBS2</i>	keine Aberration	+
2094 ♀	Schwester ist gesund	15	<i>BBS2</i>	<b>Aberration</b>	+

#### 4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalysen im *BBS2*-Gen

Das Ergebnis der Sequenzanalyse der PCR-Produkte der *BBS2*-DNA der drei Patientinnen (DNA-Nummer 2023, 2054 und 2094) und die ihrer Eltern und Geschwister sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Die Sequenzen der DNA-Fragmente aller Familienmitglieder der drei Familien und die Sequenz des DNA-Fragments von Patientin 2029 zeigten eine vollständige Übereinstimmung mit den Sequenzen der Kontrollpersonen. Auch intrafamiliär gab es keine Abweichungen in der Basensequenz. Daher wurden die Aberrationen bei diesen Patienten (2023, 2054 und 2094) nicht bestätigt.

Die Aberration der Patientin 2094 erwies sich als ein C → T Basenaustausch an Nukleotidposition 1870 in Exon 15 (p.R624X). Die Eltern und die Schwester von Patientin 2094 zeigten keine Abweichung in der Basensequenz im Vergleich zum den Kontrollpersonen (Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4: Zusammenfassung der Sequenzanalysen im *BBS2*-Gen**

Probanden	DNA-Nummer	Exon	cDNA Sequenzvariation
Vater	2194	1	Wildtyp
<b>Tochter (BBS)</b>	<b>2023</b>	<b>1</b>	<b>Wildtyp</b>
Tochter (BBS)	2193	1	Wildtyp
Mutter	2195	1	Wildtyp
<b>Patientin (BBS)</b>	<b>2029</b>	<b>4</b>	<b>Wildtyp</b>
Vater	2052	12	Wildtyp
<b>Tochter (BBS)</b>	<b>2054</b>	<b>12</b>	<b>Wildtyp</b>
Tochter (BBS)	2055	12	Wildtyp
Mutter	2053	12	Wildtyp
Vater	2091	15	Wildtyp
<b>Tochter (BBS)</b>	<b>2094</b>	<b>15</b>	<b>c.1870C&gt;T / Wildtyp</b>
Sohn	2093	15	Wildtyp
Mutter	2092	15	Wildtyp

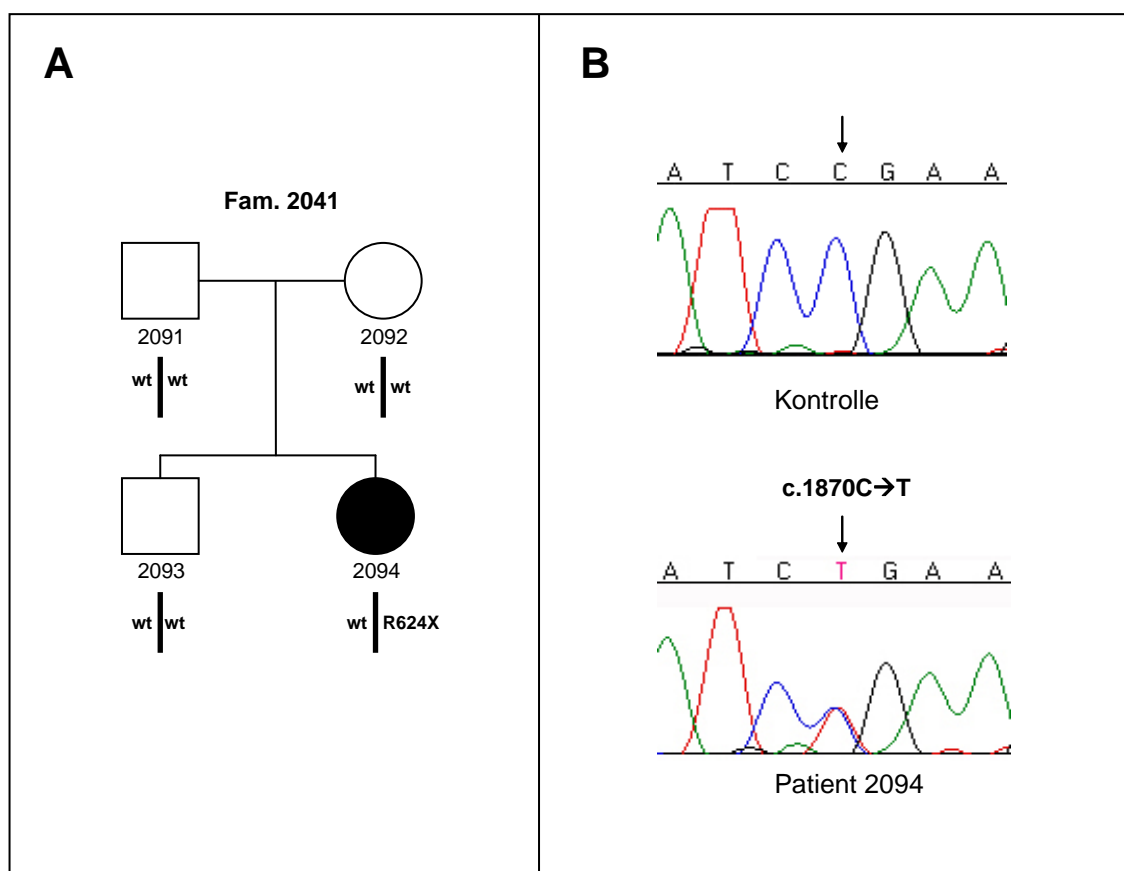
(BBS) = klinisch an BBS erkrankt. Fett = Indexpatienten.

### Punktmutation bei Patientin 2094 in *BBS2*-Exon 15

Bei Patientin 2094 liegt eine heterozygote Mutation vor (Abbildung 4–9A). Es handelt sich um den Basenaustausch C→T in Nukleotidposition 1870 in Exon 15. Der Austausch von Cytosin zu Thymin führt zu einem Stoppcodon TGA. Das Codon des Wildtyps CGA codiert an dieser Stelle die Aminosäure Arginin (Abbildung 4–9B). Die Mutation hat in der Aminosäuresequenz ein Kettenabbruch an der Stelle 624 (p.R624X) zur Folge und ist bisher nicht in der Literatur beschrieben (Tabelle 4-5).

**Tabelle 4-5: Nomenklatur der Mutation p.R624X im *BBS2*-Gen**

Sequenz	Definition	Accession	Version / Ref. Seq. ID	Variation
cDNA	Homo sapiens <i>BBS2</i> -mRNA [cDNA clone MGC:20703]	BC014140	BC014140.2 / NM_0318853	<b>c.1870C→T</b>
Protein	BBS2-Protein [Homo sapiens]	AAH14140	AAH14140.1	<b>p.R624X</b>



**Abbildung 4-9: Stammbaum mit *BBS2*-Exon 15 Genotyp und Sequenzen der Patientin**

A = Aus dem Stammbaum wird ersichtlich, dass Patientin 2094 heterozygot für p.R624X ist.

B = Sequenz des mutierten Allels von Patientin 2094 und einer wt-DNA (Kontrolle) von *BBS2* Exon 15. Die Pfeile markieren die Stelle der Punktmutation c.1870C→T.

## **4.2 Molekulargenetische Analysen des *BBS4*-Gens**

### **4.2.1 Amplifizierung der Exone des *BBS4*-Gens**

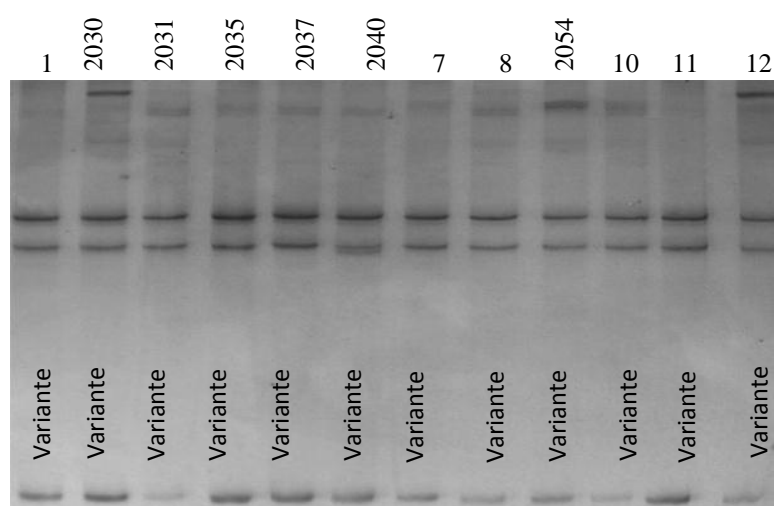
Es wurden 65 klinisch diagnostizierte BBS-Patienten unter Verwendung der SSCA untersucht. Die Primer für die PCR-Amplifikation der *BBS4*-Exons wurden aus der Arbeit von Oeffner und Mitarbeiter (2003) übernommen. Die für eine SSCA optimale Fragmentgröße der PCR-Produkte von 250 bp wurde bei keinem der 16 Exone überschritten. Die Annealingtemperaturen der jeweiligen PCR sind Tabelle 2–6 zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte durch die Analyse des Laufverhaltens der DNA-Fragmente im PAA-Gel. Bei einem aberranten Laufverhalten der DNA-Fragmente wurden die DNA-Proben der Familienangehörigen der betroffenen Patienten ebenfalls analysiert.

### 4.2.2 SSCA zur Fragmentlängen- und Konformationsanalyse in *BBS4*

Im Folgenden sind die in der SSCA aberranten DNA-Fragmente aus den Analysen des *BBS4*-Gens dargestellt (Tabelle 4-8).

#### *BBS4*-Exon 3: Primerpaar Ex3F / Ex3R

Abbildung 4–10 zeigt die SSCA von zwölf Patienten für dieses Primerpaar. Insgesamt zeigten sich vier unterschiedliche Konformationen (Abbildung 4–10). Variante 1 wird durch die DNA des Patienten 2030 und Gelspur 12, Variante 2 durch die DNA der Patienten 2031, 2035, 2037 und durch die Gelspuren 1, 7, 8, 10, 11, Variante 3 durch die DNA der Patientin 2040 und Variante 4 durch die DNA der Patientin 2054. Zur weiteren Analyse des Polymorphismus wurden die PCR-Produkte der Patienten-DNA 2030, 2031, 2040 und 2054 sequenziert (Kapitel 4.2.4, Tabelle 4-8).



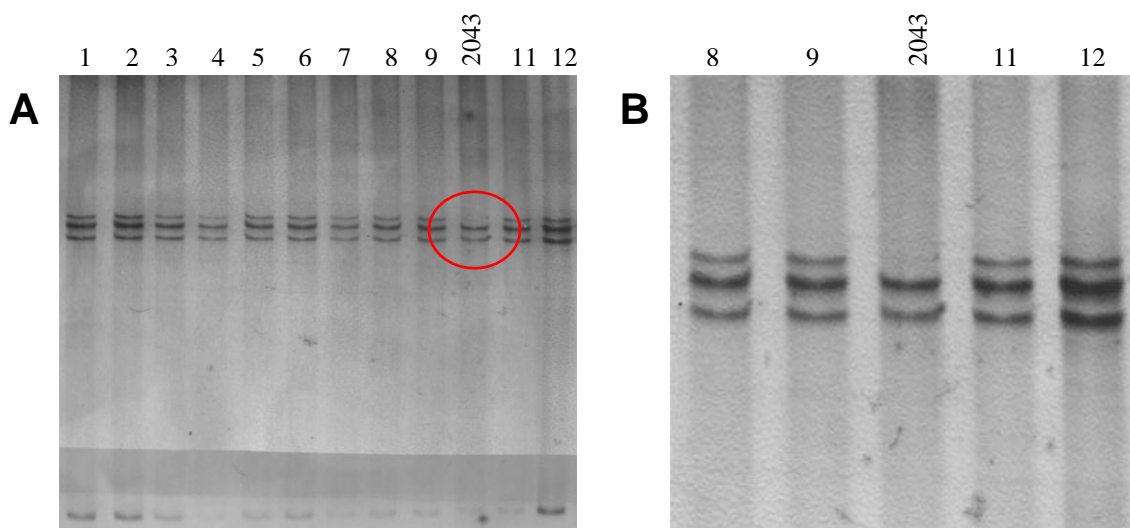
**Abbildung 4–10: SSCA des *BBS4*-Exons 3** (12 % PAA-Gel, Temperatur 10 °C, Primerpaar Ex3F / Ex13R, PCR-Produktgröße: 200 bp). Es zeigt sich ein Polymorphismus. Die vier unterschiedlichen Varianten werden durch die Patienten 2030, 2031, 2035, 2037, 2040 und Patientin 2054 und Gelspur 12 dargestellt. Die Gelspuren 1, 7–8 und 10–11 zeigen das Laufverhalten von Variante 2 der DNA von fünf Kontrollpatienten in Exon 3 *BBS4*.

**Tabelle 4-6: Polymorphismus in *BBS4*-Exon 3.** wt = Wildtyp

SSCA-Ergebnis	Häufigkeit im Patientenkollektiv
Variante 1	n=3/65 (4,6 %)
Variante 2 (wt)	n=54/65 (84,6 %)
Variante 3	n=3/65 (4,6 %)
Variante 4	n=5/65 (7,7 %)

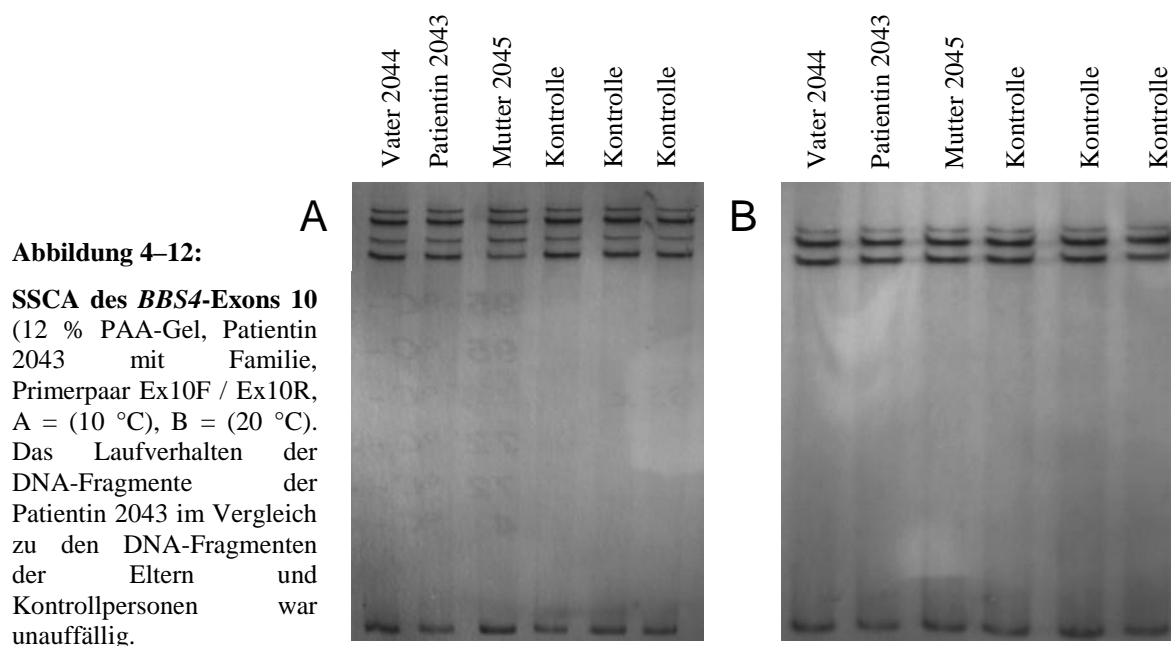
**BBS4-Exon 10: Primerpaar Ex10F / Ex10R**

Abbildung 4–11 zeigt die SSCA der DNA-Fragmente von Patientin 2043 mit dem Primerpaar Ex10F / Ex10R. Das PCR-Produkt der DNA der Patientin 2043 zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen ein abweichendes Muster im Laufverhalten (Abbildung 4–11).



**Abbildung 4–11: SSCA des *BBS4*-Exons 10** (12 % PAA-Gel, Temperatur 20 °C, Primerpaar Ex10F / Ex10R, PCR-Produktgröße: 202 bp). A = Die DNA-Fragmente von Patientin 2043 sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Das obere der drei DNA-Fragmente fehlt. Die Gelspuren 1–9 und 11–12 zeigen das Laufverhalten des Wildtypallels von elf Kontrollpatienten. B = Vergrößerter Ausschnitt der Gelspuren 8–12.

Bei der Segregationsanalyse der Patientin 2043 (Vater 2128, Mutter 2129) zeigte sich kein Hinweis für eine Aberration (Abbildung 4–12). Bei 10 °C (A) zeigte sich kein abweichendes Laufverhalten der DNA-Fragmente der Patientin im Vergleich zu den Eltern und Kontrollpersonen. Auch das Laufverhalten der DNA-Fragmente bei 20 °C (B) war unauffällig.



#### 4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der SSCA des *BBS4*-Gens

Das Laufverhalten der DNA-Fragmente des Exon 3 des *BBS4*-Gens zeigte vier unterschiedliche Varianten. Dies spricht für das Vorhandensein eines Polymorphismus (Kapitel 4.2.2, Abbildung 4-10).

In Exon 10 zeigte sich ein auffälliges DNA-Fragment bei der Patientin 2043 (Tabelle 4-7). In der Segregationsanalyse konnte dies aber nicht bestätigt werden. Daher wurde das PCR-Produkt von Patient 2043 Exon 10 *BBS4* nicht sequenziert.

In den Exons 1-2, 4-9 und 11-16 wurden mit der SSCA keine Abweichungen im Laufverhalten der DNA-Fragmente aller 65 BBS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen gefunden.

**Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der SSCA in *BBS4*.** F = Forward Primer, R = Reverse Primer.

DNA-Nummer	Exon	Gen	Anzahl auffälliger Patienten-DNA	Art der Auffälligkeit	Primerkombination
2030	3	<i>BBS4</i>	n=1/65	Polymorphismus	Ex3F / Ex3R
2031	3	<i>BBS4</i>	n=1/65	Polymorphismus	Ex3F / Ex3R
2040	3	<i>BBS4</i>	n=1/65	Polymorphismus	Ex3F / Ex3R
2054	3	<i>BBS4</i>	n=1/65	Polymorphismus	Ex3F / Ex3R
2043	10	<i>BBS4</i>	n=1/65	Aberration	Ex10F / Ex10R

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalysen im *BBS4*-Gen

Sequenziert wurde das PCR-Produkt der DNA von *BBS4* Exon 3 von vier Patienten (DNA Nummer 2030, 2031, 2040 und 2054). Patient 2030 repräsentiert die Variante 1 des Polymorphismus in *BBS4* Exon 3. Patientin 2031 die Variante 2, Patientin 2040 die Variante 3 und Patientin 2054 die Variante 4 (Abbildung 4-10). Die Sequenzen der DNA der vier Patienten zeigten eine Übereinstimmung mit den Sequenzen der DNA der Kontrollpersonen. In *BBS4* wurde daher keine Sequenzvariation gefunden.

**Tabelle 4–8: Zusammenfassung der Sequenzanalysen im *BBS4*-Gen.** wt = Wildtyp.

DNA-Nummer	Polymorphismus in der SSCA	Exon	cDNA-Sequenzvariation
2030	Variante 1	3	wt
2031	Variante 2	3	wt
2040	Variante 3	3	wt
2054	Variante 4	3	wt

### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen der *BBS2*- und *BBS4*-Gene

Aus den Analysen für die Gene *BBS2* und *BBS4* ergibt sich eine Punktmutation in *BBS2* Exon 15 (Tabelle 4-9).

**Tabelle 4–9: Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen in *BBS2* und *BBS4*.**  
x = betroffenes Gen.

Patient	<i>BBS2</i>	<i>BBS4</i>	Exon	SSCA	Sequenzanalyse
2094	x	-	15	Aberration	p.R624X / Wildtyp



## 5 Diskussion

### 5.1 Methodendiskussion

#### 5.1.1 Labormethoden

In dieser Studie wurde bei 65 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft eine Aberrationssuche mittels SSCA und eine Mutationsbestimmung mittels direkter Sequenzierung in den Kandidatengenen *BBS2* und *BBS4* durchgeführt. Der Umfang eines Aberrationsscreenings in Kandidatengenen mittels SSCA ist weniger sensitiv im Vergleich zur direkten Sequenzanalyse. Allerdings war zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung dieser Arbeit die direkte Sequenzanalyse als Standard im Labor der Humangenetik Marburg noch nicht etabliert. In den *BBS2*-Exonen 7, 11, 13 und 17 waren zum Zeitpunkt der Durchführung der praktischen Arbeit in der Literatur keine Mutationen beschrieben. Unter der Annahme, dass diese Exone keine für die Penetranz des BBS-Phänotyps wichtige Proteindomäne kodieren, wurden diese Exone nicht analysiert. Zudem war das Ziel dieser Arbeit nicht ein vollständiges Screening der Gene *BBS2* und *BBS4* durchzuführen, sondern in dem Marburger Patientenkollektiv Hinweise für einen oligonomen Vererbungsmodus zu finden. Somit wurden in *BBS2* ausschließlich die Exone 1–6, 8–10, 12 und 14–16 mittels SSCA untersucht.

Die Allelfrequenzen für mutante Allele in *BBS2* in der Studienpopulation der vorliegenden Arbeit liegt mit 0,8 % (1/130) deutlich unter den Angaben in der internationalen Literatur (5,4 %) (Muller et al. 2010). Ein Grund für diese Differenz könnten Mutationen in den nicht untersuchten Exonen in *BBS2* sein. Daher sollte in Zukunft die Analyse der Exone 7, 11, 13 und 17 nicht ausgeschlossen werden.

In *BBS4* wurden die Exone 1–16 und damit die vollständige codierende Sequenz mittels SSCA untersucht. Es wurden keine Mutationen in *BBS4* gefunden. Die Allelfrequenzen für mutante Allele in *BBS4* in dieser Studienpopulation liegt daher bei 0%. Muller und Mitarbeiter (2010) berichten hingegen über eine Allelfrequenz für mutante Allele in *BBS4* von 5,8 %. Ein möglicher Grund weshalb Muller und Mitarbeiter (2010) insgesamt mehr mutante Allele in *BBS2* und *BBS4* entdecken konnten, ist die höhere Sensitivität der angewandten Methode (direkte Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Sequenz). Darüber hinaus ist die Studienpopulation der vorliegenden

Untersuchung kleiner als die von Muller und Mitarbeitern (2010), so dass die detektieren Allelfrequenzen möglicherweise kein repräsentatives Ergebnis darstellen.

### 5.1.2 SSCA und Sequenzanalyse

Die SSCA ermöglicht einen unmittelbaren Vergleich des Laufverhaltens der Sekundärstrukturen einzelsträngiger, denaturierter DNA auf einem nicht-denaturierenden PAA-Gel. Schon ein Austausch einzelner Basen kann die Sekundärstruktur einer Nukleinsäuresequenz verändern. Daher kann sich das Laufverhalten auf dem PAA-Gel vom Wildtyp unterscheiden. Allerdings führt ein einfacher Basenaustausch nicht zwangsläufig zu einer Veränderung in der Sekundärstruktur. Die Sekundärstruktur von Nukleinsäuresequenzen unter Bedingungen der PAA-Gelelektrophorese und somit das zu erwartende Laufverhalten lässt sich demnach nicht zuverlässig voraussagen (Ziemssen et al. 2001). Bei einem Screening mittels SSCA werden Sequenzvarianten, deren Laufverhalten im PAA-Gel sich nicht von dem des Wildtyps unterscheiden, übersehen. Bei heterozygotem Genotyp machen sich Punktmutationen bei verändertem Laufverhalten des mutierten DNA-Fragments durch zusätzliche Banden bemerkbar. Handelt es sich aber bei den Mutationen um große Deletionen, taucht möglicherweise nur das Fragmentmuster des Wildtyp-Allels auf und die Deletion wird nicht detektiert.

Eine Standardisierung der methodischen Abläufe der SSCA ist wegen der vielen äußeren Einflüsse schwer zu realisieren. Eine minimale Veränderung der SSCA-Bedingungen kann zu einer veränderten Paarung der Basen führen. Dadurch sind die Ergebnisse nicht immer reproduzierbar. Dies zeigt sich in dieser Arbeit in der SSCA von Patient 2131 und der anschließenden Segregationsanalyse (Kapitel 4.1.2, Abbildung 4-4, 4-5). Zu den variierbaren SSCA-Bedingungen gehören die DNA-Konzentration, Spannung in der Pufferkammer, Laufzeit der Elektrophorese, Pufferkammertemperatur, sowie Konzentration des verwendeten PAA-Gels (8 %, 10 % oder 12 %). Für die analysierten Exone der Gene *BBS2* und *BBS4* wurden zu Beginn dieser Studie unterschiedliche Bedingungen getestet. Für das Aberrationsscreening wurden die SSCA-Bedingungen verwendet, bei denen sich die DNA-Fragmente gut abgrenzbar auf dem PAA-Gel darstellten. Eine Möglichkeit die Sensitivität der SSCA zu erhöhen, wäre die Etablierung von SSCA-Bedingungen mit DNA-Fragmenten, die ein bekanntes mutantes Allel als Kontrolle enthalten. Die Bedingungen, die das mutante Allel der Positivkontrolle detektieren, müssten dann im Screening angewandt werden.

Positivkontrollen mit definierten mutanten Allelen standen für die Gene *BBS2* und *BBS4* in dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Nicht detektierbare DNA-Fragmente auf den PAA-Gelen, trotz eines sichtbaren PCR-Produktes auf dem Agarosegel, zeigten sich in dieser Arbeit bei neun Patienten (Kapitel 4.1.3, Tabelle 4–1). Die fehlenden Ergebnisse zu diesen Analysen verändern die ermittelten Allelfrequenzen mutanter Allele im Marburger Patientenkollektiv. Es wäre sinnvoll, die DNA dieser Patienten für eine weitere Analyse erneut zu isolieren und aufzureinigen. Zielführend wäre zusätzlich die direkte Sequenzanalyse dieser DNA-Fragmente.

Nach Auswertung von SSCA mit unterschiedlichen Bedingungen kommen Hayashi und Yandell zu dem Ergebnis, dass bei einer Fragmentlänge  $< 200$  bp mit einer Sensitivität (Anteil der tatsächlich detektierten Mutationen in %) von  $> 90$  % zu rechnen ist. Bei Fragmentlängen von 300–350 bp liegt dieser Wert noch bei  $> 80$  % (Hayashi und Yandell 1993). Daher können trotz sorgfältigster Etablierung und Durchführung der SSCA 10–20 % Mutationsträger eventuell nicht erfasst werden. In Exon 10 des *BBS2*-Gens zeigte das PCR-Produkt (349 bp) der DNA-Probe von Patient 2131 eine Aberration im PAA-Gel (Abbildung 4–4A). Die Verwendung eines neuen Primerpaars, welches ein PCR-Produkt von 232 bp amplifiziert, relativierte in nachfolgenden Kontrolluntersuchungen diese Aberration (Abbildung 4–4B). Die unterschiedlichen SSCA-Ergebnisse verdeutlichen die Abhängigkeit der Untersuchungsergebnisse von der Größe des PCR-Produktes. Es bleibt zu beachten, dass die SSCA 4-4A ein falsch positives oder die SSCA 4-4B ein falsch negatives Ergebnis darstellen könnte.

Zur Entdeckung von Mutationen in bestimmten Kandidatengenen ist die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte im Vergleich zur SSCA die sensitivere und spezifischere Methode. Daher ist die direkte Sequenzierung aktuell Standard in der Routinediagnostik. Die direkte Sequenzanalyse war zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung dieser Arbeit im Labor der Humangenetik Marburg noch nicht als Routine etabliert. Von den *BBS1-12* Genen zeigen *BBS1*, *BBS10* und *BBS12* die höchste Mutationsfrequenz und tragen 75 % aller bisher bekannten Mutationen (Muller et al. 2010). Durch ein Screening der Gene *BBS2* und *BBS4* unter Verwendung der SSCA sollten potentielle Mutationsträger identifiziert werden, mit dem Nachteil, dass eventuell nicht alle Mutationen gefunden wurden. Dies zeigt die Allelfrequenz für mutante Allele von 0 % in *BBS4* und 0,8 % in *BBS2* in dieser Studie. Die internationale Literatur berichtet dagegen über eine Allelfrequenz für mutante Allele

von > 5 % für beide Gene. In Anbetracht dieser großen Differenz der Allelfrequenzen für mutante Allele in *BBS2* und *BBS4*, erscheint es sinnvoll, die Patienten-DNA dieser Gene direkt zu sequenzieren.

Prinzipiell eignet sich die SSCA potentielle Mutationsträger zu selektionieren. Die Sequenzanalyse kann anschließend zur Bestimmung der Art und Lage der Mutation und zur Differenzierung zwischen unspezifischen Einzelstrang-Konformationen und tatsächlichen Sequenzvariationen dienen.

## 5.2 Klinische und epidemiologische Diskussion

### 5.2.1 Klinische Diagnose des Bardet-Biedl Syndroms

Eine Unterscheidung zwischen dem BBS und seinen Differentialdiagnosen ist im klinischen Alltag häufig schwierig (Tabelle 5-1). Beales und Mitarbeiter (1999) formulierten Haupt- und Nebenkriterien, anhand derer die Diagnosestellung erleichtert und eine Standardisierung in der Diagnosestellung ermöglicht wird (Tabelle 1-1). Die Symptome Retinitis pigmentosa und Adipositas sind im frühen Kindesalter oft noch nicht ausgeprägt und nehmen erst in der Pubertät pathologischen Charakter an. Daher sind im Verlauf der Kindheit zumeist mehrere Kontrolluntersuchungen notwendig, um den Verdacht auf ein BBS zu bestätigen.

**Tabelle 5-1: Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl Syndroms**

OMIM	Syndrom	Symptome
245800	LMS	Retinitis pigmentosa, Hypogonadismus, Entwicklungsverzögerung
210350	Biemond II Syndrom	postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Iriskolobom, Hypogenitalismus, Entwicklungsverzögerung
266900	Senior Loken Syndrom	Retinitis pigmentosa, zystische Nierenerkrankung, Situs inversus Dandy-Walker Malformation, Lebererkrankungen
203800	Alstrom Syndrom	Retinitis pigmentosa, Adipositas, Diabetes mellitus, Schwerhörigkeit
249000	Meckel Syndrom	postaxiale Polydaktylie, Zystennieren, Encephalocele
601803	Pallister-Killian Syndrom	postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Hypogenitalismus, Zystennieren, mentale Retardierung
146510	Pallister-Hall Syndrom	postaxiale Polydaktylie, Hypogenitalismus, Nierendysplasien
225500	Ellis-Van-Creveld Syndrom	postaxiale Polydaktylie, angeborene Herzfehler, mentale Retardierung
311200	Oral-fazial-digital Syndrom	unilaterale präaxiale Polydaktylie, im Erwachsenenalter Nierenzysten, variable mentale Retardierung

Eine Retinitis pigmentosa zeigt sich bei nahezu allen erwachsenen BBS-Patienten. Bis zu einem Alter von sieben bis acht Jahren sind augenärztliche Untersuchungen bei BBS-Patienten häufig unauffällig (Beales et al. 1999). Dennoch erblinden alle BBS-Patienten durchschnittlich mit 15,5 Jahren (Runge et al. 1986, Beales et al. 1999). Dies verdeutlicht das rasche Fortschreiten der Erkrankung. Innerhalb eines Zeitraumes von zirka sieben Jahren entwickeln sich die ersten Symptome mit Visusreduktion, danach folgt Nachtblindheit bis hin zum absoluten Visusverlust.

Bei der postaxialen Polydaktylie, die bei 63–69 % der BBS-Patienten ausgebildet ist, handelt es sich um eine Blickdiagnose im Säuglings- oder Kleinkindalter (Moore et al. 2005; Beales et al. 1999). Sie tritt kongenital auf und ist immer ein differentialdiagnostischer Hinweis auf das BBS. Eine operative Korrektur der zusätzlichen Finger oder Zehen sollte im frühen Kindesalter angestrebt werden, um eine kosmetische und funktionelle Beeinträchtigung frühzeitig zu korrigieren.

Eine Adipositas ist bei mehr als der Hälfte der BBS-Patienten vorhanden. Mit Hilfe der Formel für den Body-Mass-Index (BMI) wird die Adipositas standardisiert beschrieben ( $\text{BMI} = \text{Masse (kg)} / \text{Größe (m)}^2$ ; Normbereich = 18,5 bis 24,9  $\text{kg/m}^2$ ). Obwohl bei BBS-Patienten bereits im Kindesalter oft ein erhöhter BMI vorliegt, wird die Adipositas in der Regel erst postpubertär als pathologisch eingestuft (Beales et al. 1999). Differentialdiagnostisch liegt die Schwierigkeit in der Unterscheidung zum nicht-syndromalen Übergewicht. Der Habitus der Eltern und eine Anamnese der Essgewohnheiten der BBS-Patienten helfen bei der Differenzierung.

Bei Männern mit BBS kommt es häufig zu einem hypogonadotropem Hypogonadismus. Klinisch zeigen sich ein Mikropenis und Fertilitätsstörungen (Beales et al. 1999). Bei Frauen werden komplexe urogenitale Fehlbildungen beobachtet. Klinisch können Zyklusstörungen und Fehlbildungen des inneren Genitale beobachtet werden (Bell et al. 1958, Klein und Ammann 1969). Während Fehlbildungen der Genitalien bei Männern durch eine Blickdiagnose leicht zu diagnostizieren sind, ist die Diagnosestellung bei Frauen schwieriger.

Renale Anomalien werden bei 24 % der BBS-Patienten nachgewiesen (Beales et al. 1999). Sie sind Hauptursache für die erhöhte Morbidität und Mortalität bei BBS-Patienten (Hurley et al. 1975). Bei BBS-Patienten, deren Untersuchung ein urologisches bildgebendes Verfahren beinhaltete, zeigt sich sogar in 46 % der Fälle ein pathologischer Befund (Beales et al. 1999; Moore et al. 2005). Allerdings liegt für diese Patientengruppe eine Selektion vor, da die Indikation für die Bildgebung vermutlich aufgrund von nephrologischen Symptomen gestellt wurde. Der Begriff metabolisches Syndrom beschreibt einen Zusammenhang zwischen Nierenerkrankungen, Adipositas, arteriellem Hypertonus und Diabetes mellitus und geht auch in der Normalbevölkerung mit einer erhöhten Morbidität einher.

Zur Erfassung der phänotypischen Merkmale des BBS in dem Marburger Patientenkollektiv erfolgte eine direkte Befragung der Betroffenen und ihrer Familienangehörigen. Hierfür wurde ein Fragebogen entwickelt (Meyer 2008). Da es

sich größtenteils um anamnestische Daten handelt, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten in die Studiengruppe aufgenommen wurden, die aus ärztlicher Sicht nicht die klinischen Kriterien für die Diagnose des BBS erfüllen. Für das Marburger Patientenkollektiv erfolgte daher eine molekulargenetische Verifizierung der BBS-Diagnose über einen Nachweis der häufigsten BBS-Mutationen p.M390R (Exon 12 *BBS1*) und p.C91fsX95 (Exon 2 *BBS10*). Sollten dennoch gesunde Probanden in dem Marburger Patientenkollektiv vorhanden sein, beeinflusst das die Studienergebnisse in Richtung einer geringeren Allelfrequenz und Mutationshäufigkeit.

Auch im klinischen Alltag können molekulargenetische Analysen den behandelnden Arzt bei der Diagnosefindung im frühen Kindesalter unterstützen. In der internationalen Literatur fand sich die Mutation p.M390R (Exon 12, *BBS1*) bei 18,1 % und die Mutation p.C91fsX95 (Exon 2, *BBS10*) bei 12,9 % der BBS-Patienten (Beales et al. 2003; Stoetzel et al. 2006). Daher kann eine molekulargenetische Verifizierung der klinisch diagnostizierten BBS-Patienten in Bezug auf die häufigsten BBS-Mutationen p.M390R und p.C91fsX95 ein weiterer sinnvoller Schritt in der Diagnostik sein.

### 5.2.2 Phänotypvergleich der Schwestern 2169 und 2168 aus der Kasuistik dieser Arbeit

Die große intrafamiliäre Variabilität der Symptome des BBS zeigt sich im Phänotyp der Schwestern 2169 und 2168 (Kapitel 3–2). Beide sind homozygot für p.M390R *BBS1*. In den Genen *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* sind im Rahmen der Marburger Studien keine weiteren BBS-assoziierten Mutationen gefunden worden. Dennoch unterscheidet sich der Phänotyp der Geschwister deutlich (Tabelle 3–2). Möglicherweise wird der unterschiedliche Phänotyp der Geschwister durch weitere Mutationen in bisher nicht bekannten BBS-Genen verursacht. Zusätzlich bleibt zu beachten, dass das *BBS2*-Gen nicht vollständig untersucht wurde. Es könnten daher Mutationen in den nicht untersuchten Exonen vorhanden sein, die sich auf den Phänotyp der Geschwister auswirken.

Eine ähnliche Konstellation wie bei den Geschwistern 2169 und 2168 wurde in der Literatur bereits beschrieben. Beales und Mitarbeiter (2003) konnten in zwei nicht miteinander verwandten Familien klinisch gesunde homozygote Träger der Mutation p.M390R *BBS1* nachweisen. Die Väter sind beide homozygot für p.M390R *BBS1*, die Mütter beide heterozygot für dieses Allel. Die Eltern sind klinisch gesund und zeigen keine phänotypischen Merkmale des BBS. Bei den Kindern der beiden Eltern wurde, wie bei ihren Vätern, ein homozygoter Genotyp in *BBS1* mit mutanten p.M390R-Allelen nachgewiesen. Sie erbten demnach jeweils ein krankes Allel von den Eltern. Anderes als ihre symptomlosen Väter weisen sie jedoch die klassischen phänotypischen Merkmale des BBS auf. Eine dritte Mutation in BBS-Genen wurde in den Familien nicht gefunden. Innerhalb dieser Familien finden sich also kranke und gesunde homozygote Träger der Mutation p.M390R *BBS1*. Daher ist die homozygote Mutation in diesen Familien nicht allein krankheitsauslösend. Zur Erläuterung dieser Genotypen stellen Beales und Mitarbeiter (2003) zwei Hypothesen auf:

- Bei den klinisch betroffenen homozygoten Mutationsträgern ist eine dritte Mutation vorhanden, die letztlich zum BBS-Phänotyp führt. Diese Mutation wurde entweder in der Sequenzanalyse übersehen oder befindet sich in einem bisher unbekannten BBS-Gen. Bei den symptomlosen homozygoten Mutationsträgern ist diese aggravierende Mutation nicht vorhanden.
- Umgekehrt ist es denkbar, dass bei den symptomlosen homozygoten Mutationsträgern eine dritte Mutation vorhanden ist, die den Ausbruch der



Erkrankung verhindert. Bei den klinisch betroffenen homozygoten Mutationsträgern wäre diese protektive Mutation demnach nicht vorhanden. Das bedeutet, dass bei den Vätern diese protektive Sequenzvariante vorliegt aber nicht an die Kinder vererbt wurde.

Entsprechend lässt das klinische Erscheinungsbild der Schwestern 2169 und 2168 aus dem Marburger Patientenkollektiv zwei mögliche Erklärungen zu:

- Bei Patientin 2168 ist eine zusätzliche aggravierende Mutation in einem BBS-Gen vorhanden, die zur typischen Merkmalsausprägung des BBS führt und im Rahmen dieser Studie nicht gefunden wurde.
- Oder bei Patientin 2169 ist eine zusätzliche protektive Mutation in einem BBS-Gen vorhanden. Diese protektive Mutation verhindert die Ausprägung eines für das BBS typischen Phänotyps.

Da in den Genen *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* im Rahmen der Marburger Studien keine weiteren BBS-assoziierten Mutationen gefunden worden sind, lässt sich anhand der Daten dieser Studie keine der Hypothesen bestätigen. Eine vollständige Analyse aller bisher bekannten BBS-Gene der Schwestern und Eltern wäre notwendig, um eine der Hypothesen zu bestätigen.

### **5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Marburger BBS-Arbeitsgruppe für das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit**

Aufgelistet sind die SSCA- und Sequenzvarianten in den Genen *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* aus den Dissertationen von Benjamin Frick (2007), Julia Meyer (2009) und Helene Claus (2008). Für die Gene *BBS2* und *BBS4* sind die Ergebnisse der SSCA- und der Sequenzanalysen aus der vorliegenden Arbeit abgebildet.

Im Rahmen der Dissertation Meyer (2009) wurden die Exone 4, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16 in *BBS1* untersucht. Im Rahmen der Dissertation Claus (2008) wurde eine SSCA der Exone 7 und 9 in *BBS1* durchgeführt. Zusätzlich wurde in *BBS10* das Exon 2 mittels Sequenzanalyse untersucht. Im Rahmen der Dissertation Frick (2007) wurde ein Mutationsscreening mit SSCA und anschließender Sequenzanalyse der aberranten DNA-Fragmente der codierenden Sequenz in *BBS6* durchgeführt.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ermöglicht eine Analyse hinsichtlich eines digenitrallelischen oder oligogenen Erbgangs im Marburger Patientenkollektiv.

#### **Aberrationen und Sequenzvarianten bei 65 Patienten in *BBS2* und *BBS4***

Das PCR-Produkt der DNA-Probe von Patientin 2023 in *BBS2* Exon 1 zeigte als einzige Probe ein abweichendes Laufverhalten sowohl der Doppelstrang- als auch der Einzelstrang-DNA (Kapitel 4.1.2, Abbildung 4-1). Eine Erklärung für das abweichende Laufverhalten der renaturierten DNA-Doppelstränge könnte die Ausbildung eines Heteroduplex sein. Wenn sich ein mutierter DNA-Einzelstrang mit einem unveränderten DNA-Einzelstrang des gleichen PCR-Produktes verbindet, so befinden sich in der Sequenz Abschnitte, die nicht vollständig komplementär sind. Solche Abschnitte bilden dann Schleifen aus. DNA-Fragmente mit Heteroduplexen haben ein anderes Laufverhalten im PAA-Gel als die DNA-Proben des Wildtyps.

In *BBS2* Exon 15 zeigte das PCR-Produkt der DNA-Probe von Patientin 2094 ein abweichendes Laufverhalten in der SSCA (Kapitel 4.1.2, Abbildung 4-7). Eine weitere SSCA mit den DNA-Proben der Familie konnte dieses Ergebnis allerdings nicht reproduzieren. Die SSCA in Exon 15 *BBS2* verdeutlichen die mangelnde Reproduzierbarkeit der SSCA-Ergebnisse in dieser Arbeit. Die Sequenzanalyse ergab eine heterozygote Punktmutation p.R624X bei Patientin 2094 in Exon 15 *BBS2*. Die Sequenzen der Familie waren unauffällig. Daher handelt es sich bei p.R624X vermutlich um eine Neumutation (ein Keimbahnmosaik ist nicht auszuschließen, auf Paternität und die korrekte Zuordnung der DNA-Probe wurde nicht getestet).

Neumutationen sind bei dem genetisch heterogenen BBS häufig. Harville und Mitarbeiter (2010) haben in einer Kohorte von 45 BBS-Familien 11 bisher unbekannte Mutationen entdeckt, die nicht von den Eltern vererbt wurden, und daher die Gesamtheit der BBS Mutationen um zirka 5 % (11/218) erhöht. In einer weiteren Studie konnten in einer Kohorte von 55 BBS-Familien 43 Mutationen gefunden werden. Hiervon waren 21 und daher knapp die Hälfte der nachgewiesenen Mutationen bisher unbekannt und nicht von den Eltern geerbt worden (Chen et al. 2011).

Die Mutation p.R624X bei Patientin 2094 in Exon 15 *BBS2* hat in der Aminosäuresequenz einen Kettenabbruch zur Folge (Abbildung 4–9). Bezogen auf das Patientenkollektiv dieser Studie tritt p.R624X (c.1870C→T) mit einer Allelfrequenz von 0,8 % (1/130) und einer Häufigkeit von 1,5 % (1/65) auf. Patientin 2094 ist als Einzige der Familie Trägerin einer heterozygoten Mutation in einem Exon des *BBS2*-Gens. Patientin 2094 ist auch die Einzige vom BBS Betroffene in ihrer Familie. Daher wäre es notwendig gewesen auf Paternität und die korrekte Zuordnung der DNA-Probe zu testen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Phänotyps und dieser Mutation scheint wahrscheinlich. Bei Patientin 2094 muss aufgrund der heterozygoten Situation in *BBS2* das Vorliegen mindestens einer weiteren heterozygoten Mutation angenommen werden. Diese kann sich entweder in einem der nicht untersuchten Exone des *BBS2*-Gens, in einem der anderen 15 bekannten oder in einem bisher nicht identifizierten BBS-Gen befinden. Bei Patientin 2094 konnten bei der Analyse in *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* keine weiteren Sequenzvarianten entdeckt werden.

### **Die Mutationen *BBS1* Exon 12 p.M390R und *BBS10* Exon 2 p.C91fsX95 im Marburger Patientenkollektiv**

Insgesamt wurde bei 42,6 % (23/54) der deutschen Studienpopulation des Marburger Patientenkollektivs eine der beiden Mutationen nachgewiesen, wobei p.M390R bei 14,8 % (8/54) und p.C91fsX95 bei 27,8 % (15/54) der Patienten detektiert wurde (Claus 2008). Die Mutationen p.M390R und p.C91fsX95 treten bei keinem Patienten des Marburger Patientenkollektivs in Kombination auf. Die kombinierte Allelfrequenz in der deutschen Population liegt bei 34,3 % (37/108). Zusammenfassend zeigt sich, dass nicht p.M390R die häufigste Mutation bei BBS-Patienten deutscher Herkunft ist, sondern p.C91fsX95. Knapp die Hälfte (42,6 %) der BBS-Patienten ist Träger einer der beiden Mutationen. Daher kann die klinische Diagnose des BBS durch die gezielte molekulargenetische Analyse von p.M390R und p.C91fsX95 wahrscheinlich gemacht

werden. Allerdings bedeutet ein fehlender Nachweis nicht, dass ein BBS ausgeschlossen ist.

### **Weitere Mutationen in *BBS1* und *BBS6* im Marburger Patientenkollektiv**

In *BBS1* lassen sich neben der p.M390R-Mutation bei 5,6 % andere Mutationen im Marburger Patientenkollektiv finden (Claus 2008). Die von Mykytyn und Mitarbeitern (2003) identifizierte Deletion von 5 bp in Exon 12 (C377\_F378delfsX412) und die von Beales und Mitarbeitern (2003) entdeckte Nonsensemutation in Exon 13 (p.R440X) treten auch in der Dissertation von Meyer (2008) als Sequenzvarianten mit pathologischem Wert auf. Zusätzlich wurden die Punktmutationen p.S80G und p.T91P in Exon 4 *BBS1* in heterozygoter Form bei Patientin 2087 gefunden (Meyer 2008).

Ein weiterer Patient deutscher Herkunft erbte je eine Mutation von den Eltern. Von Seiten der Mutter die Punktmutation p.A447T in Exon 13 und von Seiten des Vaters die Rasterschubmutation p.C377\_F378delfsX412 in Exon 12 (Claus 2008). Somit ist er compound-heterozygoter Genträger. Die Rasterschubmutation p.C377\_F378delfsX412 im zweiten Allel hat mit Sicherheit pathogenen Charakter, da sie zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zur langstreckigen Veränderung der Aminosäuresequenz führt (Mykytyn et al. 2003).

Eine Patientin türkischer Herkunft ist homozygote Mutationsträgerin einer Deletion von Exon 12 bis 13 in *BBS1* (c.Ex12\_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). Die Deletion führt zu einem vollständigen Funktionsverlust des *BBS1*-Gens mit weitreichenden Auswirkungen auf den BBS-Phänotyp.

Bei der Analyse des *BBS6*-Gens zeigten sich vier Sequenzvarianten (Frick 2007). Zwei der Sequenzvarianten liegen in *BBS6* Exon 3 (p.Y37C und p.I178I) und zwei in *BBS6* Exon 6 (p.R517C und p.G532V). Die Punktmutationen p.Y37C und p.G532V sind Aminosäureaustauschmutationen mit pathologischem Wert. Bei der p.I178I-Mutation handelt es sich um eine stille Mutation, die zwar einen Basenaustausch in der DNA, aber keinen Aminosäureaustausch im Protein verursacht. Die Sequenzvariante p.R517C ist ein Polymorphismus, der mit einer Allelfrequenz von 11 % in der Normalbevölkerung vorkommt (Frick 2007).

Tabelle 5–2: Zusammenfassung der SSCA- und Sequenzvarianten für das Patientenkollektiv (n=65) der vorliegenden Arbeit in *BBS1*<sup>1</sup> (Exons 4–5, 7–10, 12–13 und 15–16), *BBS2*<sup>2</sup> (Exons 1–6, 8–10, 12 und 14–16), *BBS4*<sup>2</sup> (Exons 1–16), *BBS6*<sup>3</sup> (Exons 3–6) und *BBS10*<sup>4</sup> (Exon 2).

Patient	BBS1		BBS2		BBS4		BBS6		BBS10	
	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex. 2	Sequenz-varianten
2017 ♀	12 13	c.Ex12_Ex13 Deletion homozygot	2a	SSCA Methoden- fehler	SSCA unauffällig		u n a u f f ä l l i g			
2018 ♂	12 13	c.Ex12_Ex13 Deletion homozygot	u n a u f f ä l l i g				3	p.I178I heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
2019 ♀	9  4	c.724-8G>c. heterozygot  p.L126L heterozygot	u n a u f f ä l l i g				3	p.I178I heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
2020 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2023 ♀			u n a u f f ä l l i g				3  6	p.I178I heterozygot  p.R517C heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
2024 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2025 ♂			u n a u f f ä l l i g							
2029 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2030 ♂			u n a u f f ä l l i g							
2031 ♀			u n a u f f ä l l i g						p.C91fsX95 heterozygot	
2032 ♂			u n a u f f ä l l i g							
2035 ♂	9	c.724-8G>c. heterozygot	u n a u f f ä l l i g							
2037 ♂			u n a u f f ä l l i g							
2040 ♀			u n a u f f ä l l i g						p.C91fsX95 heterozygot	
2043 ♀	9	c.830+31A>T heterozygot	u n a u f f ä l l i g							
2046 ♂			u n a u f f ä l l i g						p.C91fsX95 homozygot	
2054 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2055 ♀			u n a u f f ä l l i g						p.C91fsX95 heterozygot	
2056 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2057 ♀			u n a u f f ä l l i g							
2058 ♂			u n a u f f ä l l i g							

Fortsetzung Tabelle 5–2:

Patient	<i>BBS1</i>		<i>BBS2</i>		<i>BBS4</i>		<i>BBS6</i>		<i>BBS10</i>	
DNA Nr.	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex. 2	Sequenz-varianten
<b>2059</b> ♂		unauffällig	1	SSCA Methodenfehler		SSCA unauffällig	3	p.I178I heterozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2060</b> ♂	12 9	p.M390R homozygot c.830+31A>T heterozygot								
<b>2084</b> ♀	12	p.M390R homozygot								
<b>2061</b> ♂										
<b>2064</b> ♀										
<b>2065</b> ♂	9 4	c724-8G>c heterozygot p.L126L heterozygot	1	SSCA Methodenfehler		SSCA unauffällig	3 6	p.I178I heterozygot p.R517C heterozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2074</b> ♀										
<b>2077</b> ♀							3 6	p.I178I heterozygot p.R517C heterozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2131</b> ♂										
<b>2127</b> ♂							3 6	p.I178I heterozygot p.R517C heterozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2078</b> ♂							3 6	p.I178I heterozygot p.R517C heterozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2138</b> ♂										p.C91fsX95 heterozygot
<b>2095</b> ♂	12 13	C377_F378 delfsX412 heterozygot p.A447T heterozygot	2a	SSCA Methodenfehler		SSCA unauffällig				unauffällig
<b>2087</b> ♀	4	p.S80G heterozygot p.T91P heterozygot p.L126L heterozygot					3 3 6	p.Y37C heterozygot p.I178I heterozygot p.G532V homozygot		Sequenzanalyse unauffällig
<b>2185</b> ♀	12	p.M390R homozygot								

Fortsetzung Tabelle 5-2:

Patient	BBS1		BBS2		BBS4		BBS6		BBS10	
DNA Nr.	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex. 2	Sequenz-varianten
2192 ♂	12	p.M390R homozygot	unauffällig							
2140 ♂			unauffällig							
2165 ♀			unauffällig						p.C91fsX95 heterozygot	
2141 ♂			unauffällig							
2125 ♂	7	c519-75C>T homozygot	unauffällig				3	p.Y37C heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
	4	p.L126L homozygot					3	p.I178I heterozygot		
							6	p.G532V homozygot		
2120 ♂			unauffällig							
2089 ♂	13	p.R440X heterozygot	unauffällig				3	p.I178I heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
	9	c.724-8G>c. heterozygot					6	p.R517C heterozygot		
	4	p.L126L heterozygot								
	7	c.519-75C>T heterozygot								
2094 ♀	unauffällig		15	p.R624X heterozygot	SSCA unauffällig		unauffällig			
2109 ♂	unauffällig		1	SSCA Methoden- fehler	SSCA unauffällig		unauffällig		p.C91fsX95 homozygot	
2144 ♂	12	p.M390R heterozygot	unauffällig							
2104 ♂			unauffällig				3	p.I178I heterozygot	p.C91fsX95 homozygot	
							6	p.R517C heterozygot		
2112 ♂			unauffällig							
2186 ♂			unauffällig							
2135 ♀	12	p.M390R homozygot	unauffällig							
2105 ♂	5	IVS5+31_32 insC	unauffällig						p.C91fsX95 homozygot	
2113 ♀			unauffällig							
2147 ♂			unauffällig						p.C91fsX95 homozygot	
2156 ♀			unauffällig						p.C91fsX95 homozygot	

Fortsetzung Tabelle 5-2:

Patient	<i>BBS1</i>		<i>BBS2</i>		<i>BBS4</i>		<i>BBS6</i>		<i>BBS10</i>	
DNA Nr.	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex.	Sequenz-varianten	Ex. 2	Sequenz-varianten
<b>2168</b> ♀	12	p.M390R homozygot	u n a u f f ä l l i g							
<b>2169</b> ♀	12	p.M390R homozygot	u n a u f f ä l l i g							
<b>2160</b> ♀	12	p.M390R heterozygot	u n a u f f ä l l i g				3  6	p.I178I heterozygot  p.R517C heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
<b>2151</b> ♂			u n a u f f ä l l i g						p.C91fsX95 homozygot	
<b>2173</b> ♂			u n a u f f ä l l i g							
<b>2170</b> ♂	12	p.M390R homozygot	u n a u f f ä l l i g							
<b>2178</b> ♂	u n a u f f ä l l i g		2a	SSCA Methoden- fehler	SSCA unauffällig		u n a u f f ä l l i g			
<b>2183</b> ♂	5	c.479+8C>G homozygot	u n a u f f ä l l i g				3	p.I178I heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	
<b>2184</b> ♂			u n a u f f ä l l i g							
<b>2189</b> ♂			u n a u f f ä l l i g				3  6	p.I178I heterozygot  p.R517C heterozygot	Sequenzanalyse unauffällig	

SSCA-Methodenfehler = labortechnischer Fehler: Die DNA-Fragmente konnten in dem 12 % PAA-Gel nicht dargestellt werden. Sequenzanalyse unauffällig = in der Sequenzanalyse wurde der Wildtyp ermittelt. Rot = Geschwister der Kasuistik dieser Arbeit.

<sup>1</sup> Dissertation Meyer 2009

<sup>3</sup> Dissertation Frick 2007

<sup>2</sup> Daten der vorliegenden Arbeit

<sup>4</sup> Dissertation Claus 2008

Bei der Teilanalyse der Gene *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* konnte kein Hinweis für einen digen-triallelischen oder oligogenen Erbgang gefunden werden. Allerdings wäre eine vollständige direkte Sequenzierung der kodierenden Sequenz dieser Gene notwendig, um einen digen-triallelischen oder oligogenen Erbgang im Marburger Patientenkollektiv auszuschließen.



## 5.4 Der Vererbungsmodus des Bardet-Biedl Syndroms

Die Vererbung des BBS ist autosomal-rezessiv. Dennoch zeigen wissenschaftliche Erkenntnisse aus den letzten Jahren, dass die Expressivität und Penetranz des BBS-Phänotyps wahrscheinlich durch Mutationen in mehr als einem Genlocus beeinflusst werden. Daher kann nicht mehr ausschließlich von einem klassischen autosomal-rezessiven Erbgang gesprochen werden, der den Mendelschen Regeln folgt.

In Familien mit BBS-Patienten konnte nachgewiesen werden, dass die genetische Interaktion mindestens drei mutanter Allele auf mindestens zwei unterschiedlichen Genloci gemeinsam die Penetranz und die Expressivität des Krankheitsbildes beeinflussen (Katsanis et al. 2001a). Diese Erkenntnisse geben Hinweise für eine digentriallelische Vererbung des Phänotyps. Es ist daher anzunehmen, dass die Ausprägung des BBS-Phänotyps durch zusätzliche Mutationen in weiteren Genloci beeinflusst wird (Kasuistik Familie 2053, Kapitel 3.2), so dass aktuell ein oligogener Vererbungsmodus postuliert wird (Katsanis et al. 2004). In dieser Studie konnte bei keinem der Patienten eine Mutation in beiden Genen, *BBS2* und *BBS4*, nachgewiesen werden. Bei der Mehrzahl der klinisch diagnostizierten BBS-Patienten mit deutlich ausgeprägtem Phänotyp fanden sich bisher nur zwei mutante Allele in einem der untersuchten BBS-Gene (Tabelle 5–2).

Ein Beispiel für einen heterozygoten Genotyp ist Patientin 2094 aus der deutschen Familie 2041. Es handelt sich um den Basenaustausch C→T in Nukleotidposition 1870 in Exon 15 *BBS2* (c.1870C→T). Bei den Eltern und dem Bruder entspricht der Genotyp dem Wildtyp (Abbildung 4–9). Patientin 2094 erfüllt die klinischen Kriterien für das BBS (Beales et al. 1999). In solchen Fällen sind weitere Mutationen vorhanden, denn zur klinischen Manifestation des BBS muss mindestens ein Genlocus zwei mutante Allele aufweisen. Es ist also entweder eine zusätzliche Mutation auf dem zweiten Allel des analysierten Genlocus übersehen worden oder es sind zwei mutante Allele in einem weiteren BBS-Gen zu erwarten.

Betrachtet man die Ergebnisse der Analysen der Gene *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* in dem Marburger Patientenkollektiv zeigt sich kein Hinweis für einen oligogenen Vererbungsmodus (Tabelle 5-2). Das Ergebnis schließt oligogen betroffene Patienten in diesem Kollektiv allerdings nicht vollständig aus:

- Möglich sind Mutationen in den nicht untersuchten Exons der analysierten Gene.

- Zusätzlich können weitere Mutationen in bisher unbekannten BBS-Genen vorliegen. Möglicherweise würde eine Vergrößerung des Patientenkollektivs die von Beales und Mitarbeiter (2003), Mykytyn und Mitarbeiter (2003) und Stoetzel und Mitarbeiter (2006a) postulierte oligogene Beteiligung der in der Marburger Arbeitsgruppe untersuchten Gene darstellen.
- Desweiteren wäre es denkbar, dass mit der SSCA Mutationen in den untersuchten Exons der analysierten Gene übersehen wurden. Eine direkte Sequenzanalyse aller BBS-Gene der Mutationsträger des Marburger Patientenkollektivs wurde möglicherweise einen oligogenen Erbgang aufdecken.

## 5.5 Die humangenetische Beratung bei BBS-Familien

Die humangenetische Beratung bietet betroffenen Personen und deren Familien detaillierte Information zu einer bestehenden oder vermuteten Erkrankung. Zusätzlich klärt sie über Vererbungsrisiken bzw. Wiederholungsrisiken auf. Das BBS wird autosomal-rezessiv vererbt. Nach dem aktuellen Kenntnisstand wird die Merkmalsausprägung jedoch sehr wahrscheinlich digen oder oligogen bestimmt.

Nach dem klassischen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus müssen in einem Gen mindestens zwei kranke Allele vorliegen (monogen). Betroffene sind daher Träger mindestens einer homozygoten Mutation oder einer compound-heterozygoten Mutation in einem Gen. Phänotypisch gesunde Eltern von betroffenen Kindern müssen mindestens Träger einer heterozygoten Mutation in einem BBS-Genlocus sein. Als Beispiele für homozygote Mutationsträger können die deutschen Schwestern 2169 und 2168 aus dieser Studie herangezogen werden (Kapitel 3.2). Beide Eltern sind klinisch gesunde heterozygote Mutationsträger für p.M390R in *BBS1*. Die Geschwister sind jeweils homozygot für p.M390R in *BBS1* und an BBS erkrankt (Abbildung 3–1). In den in dieser Studie analysierten BBS-Genen der Geschwister wurden keine weiteren Mutationen gefunden. Nach den Hypothesen von Beales und Mitarbeitern (2003), müssen phänotypisch unauffällige Mitglieder einer BBS-Familie nicht immer heterozygote Mutationsträger oder homozygote Träger des Wildtyps sein (Kapitel 5.2.2). Das Auftreten gesunder homozygoter Mutationsträger ist auf die Vielfalt der Interaktionsmöglichkeiten mehrerer Mutationen in mehreren Genloci zurückzuführen (Katsanis et al. 2004). Diese Interaktionen sind typisch für einen digen-triallelischen oder oligogenen Vererbungsmodus. Hierbei sind mehr als zwei mutante Allele in mindestens zwei BBS-Genen an der Penetranz und Expressivität des Syndroms

beteiligt. Bei einem solchen Vererbungsmodus sind die genotypischen Voraussetzungen zur Manifestation des Phänotyps im Vergleich zu einem autosomal-rezessivem Erbgang komplexer. Das Erkrankungsrisiko ist bei digenen und oligogenen Vererbungsmodi niedriger als bei rein autosomal-rezessiven Erbgängen. Aktuell ist nicht abschließend geklärt, wie häufig die Ausprägung des BBS durch eine digen-triallelische oder oligogene Vererbung auftritt. Leitch und Mitarbeiter (2008) und Chen und Mitarbeiter (2011) berichten über Beispiele mit komplexen oligogenen Vererbungen des BBS. In einer Studie mit 55 BBS-Familien wurden in 46 Familien BBS-assoziierte Mutationen gefunden. Bei neun Familien wurden 3 Mutationen in zwei unterschiedlichen BBS-Genen gefunden (Chen et al. 2011). Bei den Individuen in diesen Familien liegt möglicherweise ein digen-triallelischer Erbgang der BBS-Mutationen vor. Vermutlich treten solche Fälle allerdings in weniger als 10 % der betroffenen BBS-Familien auf. Daher sollte den nach Rat suchenden Familien im Rahmen einer genetischen Beratung zunächst die Wahrscheinlichkeiten des klassischen autosomal-rezessiven Erbgangs vorgestellt werden. Dies verhindert eine Unterschätzung der Erkrankungsrisiken. Die genetische Beratung hereditärer Erkrankungen wird zusätzlich dadurch erschwert, dass krankheitsauslösende Mutationen in noch unbekannten BBS-Genloci lokalisiert sein können und damit nicht detektiert werden können.

Der Nachweis der häufigen Mutationen p.M390R BBS1 und p.C91fsX95 BBS10 kann im Rahmen der genetischen Beratung sinnvoll sein. Die Ergebnisse der Marburger Arbeitsgruppe zeigen, dass bei deutschen Patienten mit klinisch manifestem BBS, die Allele p.M390R und p.C91fsX95 bei 42,6 % der Fälle auftreten. So kann bei knapp der Hälfte der Patienten deutscher Herkunft die Diagnose des BBS molekulargenetisch bestätigt werden. Schließt man die ausländischen BBS-Patienten ein, beträgt die Häufigkeit immer noch 32 %. Daher kann selbst in einer epidemiologisch gemischten Population die Diagnose noch zu knapp einem Drittel molekulargenetisch festgestellt werden. Die klinische Diagnose BBS ist nach der Genotypisierung von p.M390R und p.C91fsX95 gesichert, sodass für diese Patienten und ihre Angehörigen Untersuchungen zur weiterführenden Diagnostik unnötig sind. Allerdings schließt ein negatives Testergebnis ein BBS nicht aus.

## 5.6 Ausblick

Bisher sind 16 *BBS*-Gene identifiziert. Um die Frage zu beantworten, ob in einem Patientenkollektiv Hinweise für einen digen-triallelischen oder oligogenen Vererbungsmodus vorliegen, müssten zumindest alle bekannten Gene vollständig analysiert werden. Die SSCA ist eine kosteneffektive und zeiteffiziente Screeningmethode von Kandidatengenen. Allerdings ist die Sensitivität der SSCA niedriger als die der direkten Sequenzanalyse. Dies zeigen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Selbst bei wiederholt nachgewiesenen Aberrationen in der SSCA wurde in der anschließenden Sequenzanalyse keine Variation bestätigt.

Der zeitliche Aufwand einer vollständigen Analyse der 16 *BBS*-Gene mit der SSCA übertrifft bei weitem den neuerer Untersuchungsmethoden. Das estländische Unternehmen Asper Ophthalmics bietet eine DNA-Analyse in *BBB1-BBS12* an. Sie nutzen die Mikroarray-basierte APEX Methode (Arrayed Primer Extension). Diese ermöglicht eine gleichzeitige und kosteneffektive Analyse bereits bekannter und vordefinierter Mutationen dieser *BBS*-Gene. Die Ergebnisse können bereits sieben Tage nach dem Eintreffen der DNA-Proben über eine Datenbank zur Verfügung gestellt werden. Zu beachten bleibt, dass *BBS* eine Erkrankung mit einer hohen genetischen Heterogenität ist. Es ist zu erwarten, dass eine Vielzahl der *BBS*-Mutationen bisher nicht bekannt ist. Eine Analyse mit dem Mikroarray-System detektiert lediglich bereits bekannte Mutationen. Zur Suche von bisher unbekannten Mutationen ist die Methode daher nicht sinnvoll.

In dieser Arbeit wurde insgesamt nur eine Mutation in den Genen *BBS2* und *BBS4* gefunden. Möglicherweise wäre eine Analyse mit einem Mikroarray-System erfolgreicher gewesen. Zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung dieser Arbeit, 08/2003 bis 03/2004, war das Mikroarray-System noch nicht in der Routinediagnostik etabliert. Heute ist die DNA-Chip-Technologie fester Bestandteil in der genetischen Routinediagnostik.

In den letzten Jahren wurde ein Sequenzierverfahren, das Next Generation Sequencing entwickelt, mit dem ein extrem hoher Probendurchsatz in kurzer Zeit möglich ist. Diese Technologie beruht auf der Idee einer parallelen Sequenzierung von Millionen identischer DNA-Fragmente in einem einzigen Sequenzierlauf. Aufgrund dieser höheren Sequenzierleistung wäre es möglich, alle mit dem *BBS* assoziierten Gene gleichzeitig und auch hinsichtlich unbekannter Mutationen zu analysieren. Dies ist

insbesondere bei Erkrankungen mit einer hohen genetischen Heterogenität, wie dem BBS, von Vorteil. Daher wird diese Methode in Zukunft bei der Diagnose humangenetischer Erkrankungen zunehmend eine Rolle spielen.

Das Grundlagenwissen über das BBS hat in den letzten Jahren rasch zugenommen. Es war eines der ersten Syndrome, das ätiologisch mit der Dysfunktion von Zilien in Verbindung gebracht wurde. Zilien sind maßgeblich an der Funktion und Entwicklung vieler Organsysteme beteiligt. Die unterschiedlichen Haupt- und Nebenkriterien des BBS reflektieren diesen Zusammenhang. Aus der großen Zahl der potentiell beteiligten Gene und Mutationen erklärt sich die Heterogenität des BBS-Phänotyps. Die Erforschung des BBS kann multiple Ansätze zur Ätiologie primärer Ziliopathien liefern. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Erkenntnisse über den Erbgang des BBS zu erweitern. Die Ergebnisse aus dem Marburger Patientenkollektiv zeigen kein Hinweis für einen digenen oder oligogenen Erbgang. Bisher ist es auch noch nicht gelungen, den einzelnen Mutationen in den BBS-Genen eine bestimmte phänotypische Ausprägung des BBS zuzuordnen. Mit zunehmendem Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung gestörter Zilienfunktion kann zukünftig die klinische Prognose des Krankheitsverlaufs des BBS verbessert werden, was die humangenetische Beratung unterstützen wird. Es bleibt abzuwarten, in wieweit die Ergebnisse dieser Studie den betroffenen Familien und behandelnden Ärzten im Umgang mit der Erkrankung helfen können.

## 6 Zusammenfassung

Das Bardet-Biedl Syndrom (BBS, OMIM 209900) ist eine multisystemische Erkrankung, die durch eine Dysfunktion ziliärer Strukturen verursacht wird. Für den Phänotyp sind Retinitis pigmentosa, postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Hypogonadismus bei Männern, komplexe urogenitale Fehlbildungen bei Frauen und Nierenfehlbildungen als Kardinalsymptome charakteristisch. Zusätzlich besteht ein vermehrtes Auftreten von mentaler Retardierung, Bluthochdruck, Taubheit, angeborenen Herzfehlern und Diabetes mellitus.

Bisher sind 16 BBS-Gene (*BBS1-BBS16*) identifiziert. Verschiedene Genotypen von BBS-Patienten geben Hinweise, dass das BBS nicht ausschließlich klassisch autosomal-rezessiv, sondern digen-triallelisch oder oligogen vererbt wird. Das vielfältige klinische Erscheinungsbild des Syndroms lässt vermuten, dass unterschiedliche Kombinationen von Mutationen in mehr als einem BBS-Gen Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps haben. Dies zeigt sich auch bei den Schwestern der Kasuistik dieser Arbeit.

Mutante Allele treten in einer europäischen Population im *BBS2*-Gen mit einer Häufigkeit von 5,4 % und in *BBS4* mit 5,8 % bezogen auf *BBS1-12* auf (Muller et al. 2010). Nach *BBS1*, *BBS10* und *BBS12* ist *BBS4* das Gen mit der höchsten Frequenz für mutante Allele. Außerdem sind *BBS2* und *BBS4* häufig an der von Katsanis und Mitarbeiter (2004) postulierten digen-triallelsichen oder oligogenen Vererbung beteiligt. Aus den Studien der Marburger Arbeitsgruppe lagen bereits Mutationsanalysen zu den Genen *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* vor. Daher war die Fragestellung dieser Studie, ob es im Marburger Patientenkollektiv von 65 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten (57 Deutsche und 8 Türken) Hinweise für einen digenen oder oligogenen Vererbungsmodus im Zusammenhang mit den Genen *BBS2* und *BBS4* gibt. Die molekulargenetische Analyse umfasste die Exons 1–6, 8–10, 12 und 14–16 in *BBS2* und alle 16 Exons in *BBS4*. Als Screeningmethode wurde die *single-stranded-conformational analysis* (SSCA) angewandt. Insgesamt wurden in *BBS2* mittels SSCA vier auffällige DNA-Fragmente gefunden, die anschließend mit einer Sequenzanalyse weiter untersucht wurden. Zusammenfassend zeigte sich in *BBS2* eine Sequenzvariante in Exon 15, c.1870C>T (p.R624X), die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Die Mutation hat in der Aminosäuresequenz ein Kettenabbruch an der Stelle 624 zur Folge. Es ist nicht davon auszugehen, dass sie bei der betroffenen Patientin 2094 krankheitsauslösend ist, da sie in heterozygoter Form vorliegt.

In *BBS4* wurden mittels SSCA in Exon 3 DNA-Fragmente mit einem aberranten Laufverhalten im Sinne eines Polymorphismus gefunden. Die Sequenzanalyse von vier PCR-Produkten, die jeweils eine Variante des Polymorphismus repräsentierten, ergab keine Mutation.

Die Mutationshäufigkeit in *BBS2* und *BBS4* ist in dieser Studienpopulation im Vergleich zu den internationalen Daten zu niedrig. Mit einer Häufigkeit von mutanten Allelen von 5,4 % in *BBS2* und in *BBS4* mit 5,8 % hätten pro Gen 3-4 Mutationen gefunden werden müssen.

Der Genotyp der Familie 2053 der Kasuistik dieser Studie zeigt ein Beispiel für den klassischen autosomal-rezessiven, monogenen Erbgang. Die Eltern waren heterozygote Mutationsträger von p.M390R in *BBS1* und zeigten keine klinischen Merkmale des BBS. Die Schwestern 2169 und 2168 waren beide homozygot für p.M390R und vom BBS betroffen (Meyer 2009; Claus 2008). In den Genen *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* wurden bei Patientin 2168 und 2169 keine weiteren Mutationen gefunden. Trotz eines identischen Genotyps in *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* sind die klinischen Merkmale des BBS bei Patientin 2168 deutlicher ausgeprägt als bei ihrer Schwester 2169. Dies ist möglicherweise durch zusätzliche Mutationen in den nicht untersuchten BBS-Genen bedingt.

Insgesamt wurden durch die Marburger Arbeitsgruppe fünf (*BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10*) von 12 BBS-Genloci, die zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung dieser Arbeit bekannt waren, analysiert. Die Ergebnisse wurden in dieser Studie zusammenfassend analysiert (Tabelle 5-2). Es ließen sich bei keinem Patienten mutante Allele in mehr als einem BBS-Gen nachweisen. Dies schließt aber digen-triallelische oder oligogene Mutationsträger nicht aus, da möglicherweise methodenbedingt Mutationen übersehen wurden oder weitere Mutationen in den nicht untersuchten BBS-Genen liegen. Für die Suche digen-triallelischer oder oligogener Mutationsträger in dem Marburger Patientenkollektiv, müssten in weiterführenden Studien alle 16 BBS-Gene analysiert werden. Methodisch bieten sich dazu aktuell die DNA-Chip-Technologie, mit der Einschränkung, dass nur bekannte Mutationen detektiert werden oder das Next Generation Sequencing an.

## 7 Abkürzungen

Acc.No.	Identifikationsnummer der Genbank
<i>AvaII</i>	<i>Anabaena variabilis</i> II
BBS	Bardet-Biedl Syndrom
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar(e)
cM	Centimorgan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F	Forward
HGMP	Human Genome Mapping Project Resource
HUGO	Human Genome Project
IFT	intraflagellärer Transport
Kb	Kilobasen
LMS	Laurence-Moon Syndrom
MKKS	McKusick-Kaufman Syndrom
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OFD1	Oral-fazial-digital-Syndrom Typ I
OGT	O-N-Acetylglucosamin-Transferase
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAA	Polyacrylamid
PCM1	pericentriolar material 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Reverse
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
Rebase	Restriction Enzyme Database
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSCA	Single-strand conformation analysis
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
U	Units
Wt	Wildtyp
w/v	weight per volume



## 8 Literaturverzeichnis

- Ansley SJ, JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628-633
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, vol.7, pp.125-148
- Baker K, Beales PL (2009) Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:281-295
- Bardet G (1920) Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes cliniques de l'obesite hypophysaire). Thesis: Paris 479
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36:437-446
- Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187-1199
- Beales PL (2005) Lifting the lid on Pandora's box: the Bardet-Biedl syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 15:315-323
- Bell J (1958) The Laurence-Moon syndrome. In: Penrose LS (ed) *The Treasury of Human Inheritance*. Cambridge University Press, UK, pp 51-96
- Bialas NJ, Inglis PN, Li C, Robinson JF, Parker JD, Healey MP, Davis EE, Inglis CD, Toivonen T, Cottell DC, Blacque OE, Quarmby LM, Katsanis N, Leroux MR (2009) Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *J Cell Sci* 122:611-624
- Biedl A (1922) Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Dtsch. Med. Wschr.* 48
- Billingsley G, Bin J, Fieggen KJ, Duncan JL, Gerth C, Ogata K, Wodak SS, Traboulsi EI, Fishman GA, Paterson A, Chitayat D, Knueppel T, Millan JM, Mitchell GA, Deveau C, Heon E (2010) Mutations in chaperonin-like BBS genes are a major contributor to disease development in a multiethnic Bardet-Biedl syndrome patient population. *J Med Genet* 47:453-463

- Blacque OE, Reardon MJ, Li C, McCarthy J, Mahjoub MR, Ansley SJ, Badano JL, Mah AK, Beales PL, Davidson WS, Johnsen RC, Audeh M, Plasterk RH, Baillie DL, Katsanis N, Quarmby LM, Wicks SR, Leroux MR (2004) Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18:1630-1642
- Blacque OE, Leroux MR (2006) Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci* 63:2145-2161
- Bruhl P, Schwanitz G, Mallmann R, Muller SC, Raff R (2001) [Bardet-Biedl syndrome: aspects of nephro-urology and human genetics]. *Klin Padiatr* 213:8-12
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-144
- Burghes AH, Vaessin HE, de La Chapelle A (2001) Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science* 293:2213-2214
- Campo RV and Aaberg TM (1982) Ocular and systemic manifestations of the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Ophthalmol* 94:750-6
- Chen J, Smaoui N, Hammer MB, Jiao X, Riazuddin SA, Harper S, Katsanis N, Riazuddin S, Chaabouni H, Berson EL, Hejtmancik JF (2011) Molecular analysis of Bardet-Biedl syndrome families: report of 21 novel mutations in 10 genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:5317-5324
- Claus H, Frick B, Meyer J, Panzner G, Oeffner F, Koch MC (2007) *BBS1* and *BBS10* molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome. *Medizinische Genetik* 19:64
- Claus H (2008), Mutationsanalysen in *BBS1* und *BBS10* bei Patienten mit dem Bardet-Biedl-Syndrom. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, Nishimura DY, Braun TA, Kim KY, Huang J, Elbedour K, Carmi R, Slusarski DC, Casavant TL, Stone EM, Sheffield VC (2006) Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6287-6292
- Cramer B, Green J, Harnett J, Johnson GJ, McManamon P, Farid N, Pryse-Phillips W, Parfrey PS (1988) Sonographic and urographic correlation in Bardet-Biedl syndrome (formerly Laurence-Moon-Biedl syndrome). *Urol Radiol* 10:176-80
- David A, Bitoun P, Lacombe D, Lambert JC, Nivelon A, Vigneron J, Verloes A (1999) Hydrometrocolpos and polydactyly: a common neonatal presentation of Bardet-Biedl and McKusick-Kaufman syndromes. *J Med Genet* 36:599-603
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12

- Farag TI, Teebi AS (1988) Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population. *Clin Genet* 33:78-82
- Farag TI, Teebi AS (1989) High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet* 36:463-464
- Fausser S, Munz M, Besch D (2003) Further support for digenic inheritance in Bardet-Biedl syndrome. *J Med Genet* 40:e104
- Frick B (2007) Zur Frage der Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS), Molekulargenetische Analysen in den Genen *BBS1* und *BBS6*. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Green JS, Parfrey PS, Harnett JD, Farid NR, Cramer BC, Johnson G, Heath O, McManamon PJ, O'Leary E, Pryse-Phillips W (1989) The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321:1002-1009
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 5:111-117
- Harville HM, Held S, Diaz-Font A, Davis EE, Diplas BH, Lewis RA, Borochowitz ZU, Zhou W, Chaki M, MacDonald J, Kayserili H, Beales PL, Katsanis N, Otto E, Hildebrandt F (2010) Identification of 11 novel mutations in eight BBS genes by high-resolution homozygosity mapping. *J Med Genet* 47:262-267
- Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2:338-346
- Hichri H, Stoetzel C, Laurier V, Caron S, Sigaudy S, Sarda P, Hamel C, Martin-Coignard D, Gilles M, Leheup B, Holder M, Kaplan J, Bitoun P, Lacombe D, Verloes A, Bonneau D, Perrin-Schmitt F, Brandt C, Besancon AF, Mandel JL, Cossee M, Dollfus H (2005) Testing for triallelism: analysis of six BBS genes in a Bardet-Biedl syndrome family cohort. *Eur J Hum Genet* 13:607-616
- Hoskins BE, Thorn A, Scambler PJ, Beales PL (2003) Evaluation of multiplex capillary heteroduplex analysis: a rapid and sensitive mutation screening technique. *Hum Mutat* 22:151-157
- Hurley RM, Dery P, Norady MB, Drummond KN (1975) The renal lesion of the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *J Pediatr* 87:206-9
- Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, et al. (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 76:493-504
- Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70

- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001a) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256-2259
- Katsanis N, Lupski JR, Beales PL (2001b) Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10:2293-2299
- Katsanis N (2004) The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R65-71
- Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462-470
- Kim J, Krishnaswami SR, Gleeson JG (2008) CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum Mol Genet* 17:3796-3805
- Kim SK, Shindo A, Park TJ, Oh EC, Ghosh S, Gray RS, Lewis RA, Johnson CA, Attie-Bittach T, Katsanis N, Wallingford JB (2010) Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* 329:1337-1340
- Klein D, Ammann F (1969) The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies. *J Neurol Sci* 9:479-513
- Kyttala M, Tallila J, Salonen R, Kopra O, Kohlschmidt N, Paavola-Sakki P, Peltonen L, Kestila M (2006) MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat Genet* 38:155-157
- Laurence JZ, Moon RC (1866) Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Ophthalmol Rev* 2:32-41
- Laurier V, Stoetzel C, Muller J, Thibault C, Corbani S, Jalkh N, Salem N, Chouery E, Poch O, Licaire S, Danse JM, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Megarbane A, Mandel JL, Dollfus H (2006) Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2, BBS10), three mutations, but no triallelism. *Eur J Hum Genet* 14:1195-1203
- Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfarhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40:443-448
- Mehrotra N, Taub S, Covert RF (1997) Hydrometrocolpos as a neonatal manifestation of the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 69:220

- Meyer J (2009) Das klinische Bild und die Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms, Molekulargenetische Analysen im *BBS1*-Gen. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Moore SJ, Green JS, Fan Y, Bhogal AK, Dicks E, Fernandez BA, Stefanelli M, Murphy C, Cramer BC, Dean JC, Beales PL, Katsanis N, Bassett AS, Davidson WS, Parfrey PS (2005) Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am J Med Genet A* 132:352-360
- Muller J, Stoetzel C, Vincent MC, Leitch CC, Laurier V, Danse JM, Helle S, et al. Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. (2010) *Hum Genet* 127:583-593
- Myktyyn K, Braun T, Carmi R, Haider NB, Searby CC, Shastri M, Beck G, Wright AF, Iannaccone A, Elbedour K, Riise R, Baldi A, Raas-Rothschild A, Gorman SW, Duhl DM, Jacobson SG, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2001) Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat Genet* 28:188-191
- Myktyyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC (2002) Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435-438
- Myktyyn K, Nishimura DY, Searby CC, Beck G, Bugge K, Haines HL, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Iannaccone A, Jacobson SG, Weleber RG, Wright AF, Riise R, Hennekam RC, Luleci G, Berker-Karauzum S, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2003) Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet* 72:429-437
- Myktyyn K, Mullins RF, Andrews M, Chiang AP, Swiderski RE, Yang B, Braun T, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2004) Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8664-8669
- Nadjmi B, Flanagan MJ, Christian JR (1969) Laurence-Moon-Biedl syndrome, associated with multiple genitourinary tract anomalies. *Am J Dis Child* 117:352-6

- Nishimura DY, Searby CC, Carmi R, Elbedour K, Van Maldergem L, Fulton AB, Lam BL, Powell BR, Swiderski RE, Bugge KE, Haider NB, Kwitek-Black AE, Ying L, Duhl DM, Gorman SW, Heon E, Iannaccone A, Bonneau D, Biesecker LG, Jacobson SG, Stone EM, Sheffield VC (2001) Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum Mol Genet* 10:865-874
- Nishimura DY, Fath M, Mullins RF, Searby C, Andrews M, Davis R, Andorf JL, Myktyyn K, Swiderski RE, Yang B, Carmi R, Stone EM, Sheffield VC (2004) Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16588-16593
- Nishimura DY, Swiderski RE, Searby CC, Berg EM, Ferguson AL, Hennekam R, Merin S, Weleber RG, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2005) Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 77:1021-1033
- Oeffner F, Lerche D, Hoffmeister H, Bornholt D, Kersten J, Abdel-Aleem A, Rubeck A, Neundorff A, Moch C, Grzeschik K-H, Koch MC (2003) Mutation analysis in Bardet-Biedl syndrome. *Medizinische Genetik* 15:325
- Otto EA, Hurd TW, Airik R, Chaki M, Zhou W, Stoetzel C, Patil SB, et al. (2010) Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat Genet* 42:840-850
- Runge P, Calver D, Marshall J, Taylor D (1986) Histopathology of mitochondrial cytopathy and the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Br J Ophthalmol* 70:782-96
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332
- Slavotinek AM, Stone EM, Myktyyn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:15-16
- Srinivas V, Winsor GM, Dow D (1983) Urologic manifestations of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Urology* 21:581-3
- Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, et al. (2006a) BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38:521-524

- Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghoul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravel TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2007) Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1-11
- Stoler JM, Herrin JT, Holmes LB (1995) Genital abnormalities in females with Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55:276-278
- Stone DL, Slavotinek A, Bouffard GG, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Barr M, Biesecker LG (2000) Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kaufman syndrome. *Nat Genet* 25:79-82
- Teebi AS (1994) Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J Med Genet* 31:224-233
- Tobin JL, Beales PL (2007) Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium. *Pediatr Nephrol* 22:926-936
- Uguralp S, Demircan M, Cetin S, Sigirci A (2003) Bardet-Biedl syndrome associated with vaginal atresia: a case report. *Turk J Pediatr* 45:273-5
- Yen HJ, Tayeh MK, Mullins RF, Stone EM, Sheffield VC, Slusarski DC (2006) Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet* 15:667-677
- Young TL, Woods MO, Parfrey PS, Green JS, O'Leary E, Hefferton D, Davidson WS (1998) Canadian Bardet-Biedl syndrome family reduces the critical region of BBS3 (3p) and presents with a variable phenotype. *Am J Med Genet* 78:461-467
- Ziemssen F, Schnepf R, Pfeiffer A (2001) SSCP (single strand conformation polymorphism) analysis for detection of point mutations. A technique and its limits exemplified by dominantly inherited forms of diabetes (MODY). *Med Klin (Munich)* 96:515-5209
- Zimmermann, K. W., (1898) Beitrage zur Kenntniss einiger Drüsen und Epithelien. *Arch. mikr. Anat.*, 52, 552.

## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Arnold	Herzum	Neubauer	Vanucchi
Aumüller	Hofmann	Oertel	Vetter
Baacke	Hoyer	Ossendorf	Vogelmaier
Beyer			Vogt
Barth	Kern	Printz	Voigt
Basler	Klose		von Garrel
Baum	Koch	Rausch	
Behr	Koolmann	Remmschmidt	Wagner
Bünz	Kretschmer	Renz	Walter
Buchert	Kroll	Richter	Walthers
	Kuhlmann	Ritter	Weber
Celik		Röhm	Weihe
Cetin	Langer	Rothmund	Werner
Czubayko	Lemke		Wirth
	Löffler	Schäfer	Wulff
Daut	Lohoff	Schäfer	
Dobbelstein		Schmidt	Zielcke
	Maier	Schmidt	
Engenhardt-Cabilic	Mairsch	Schnabel	
	Mann	Seitz	
Gassner	Martin	Steiniger	
Geuss	Meinhart	Stiletto	
Görg	Moll	Strutz	
Gotzen	Moosdorf		
Grau	Müller	Torossian	
Griss	Mutters		



## 9.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Kai Uwe Nagel
Geburtsdatum	13.09.1976
Geburtsort	Lich
Familienstand	ledig

### Schulische Ausbildung

1983 – 1987	Grundschule Schule am Diebsturm, Grünberg Oberhessen
1987 – 1988	Elgin Elementary / Middle School, Bundesstaat Oklahoma (USA)
1989 – 1993	Realschule Speicher, Speicher
1993 – 1996	Max-Eyth Schule, Alsfeld (Abitur 1996)

### Wehrdienst

1996 – 1997	Bundeswehr, 3. BeobPzArtBtl 121
-------------	---------------------------------

### Universitäre Ausbildung

1997 – 1998	Premedical Program des Butte College in Chico, Bundesstaat Californien (USA)
1998 – 2000	Studiengang Biomedizintechnik an der Fachhochschule Gießen / Friedberg
2000 – 2006	Studiengang Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg, Approbation 2006
2008 – 2010	Studiengang Health Care Management an der Universität Bayreuth, Abschluss Master of Business Administration (MBA)

### **Beruflicher Werdegang**

2006 – aktuell	Arzt in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie und plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg
02/2012	Anerkennung zum Facharzt für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde

### **Wissenschaftliche Arbeit**

08/03 – 03/04	Dissertation zum Thema: Mutationsanalysen in <i>BBS2</i> und <i>BBS4</i> bei Patienten mit dem Bardet-Biedl Syndrom
11/09 – 03/10	Masterarbeit zum Thema: Prozessoptimierung in der Poliklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Regensburg durch die Implementierung eines klinischen Behandlungspfads und eines Casemanagements

### **Mitgliedschaften**

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-chirurgie e.V. (DGHNO)

The European Academy of Facial Plastic Surgery (EAFPS)

Deutsche Gesellschaft für Berg- und Expeditionsmedizin (BexMed)

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit, **Mutationsanalysen in *BBS2* und *BBS4* bei Patienten mit dem Bardet-Biedl Syndrom**, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort: Regensburg

Datum: 11.07.2012

Unterschrift:

Kai Nagel, Arzt